

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Petra Miškec 782/PI

**IZDVAJANJE I KARAKTERIZACIJA  
KSILANA IZ LJUSKE ORAHA**

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Draženke Komes red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice Aleksandre Vojvodić Cebin, dipl. ing.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Sustainable Production of Bioethanol and Biochemicals from Agricultural Waste Lignocellulosic Raw Materials“ (SPECH-LRM; broj 9158)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### IZDVAJANJE I KARAKTERIZACIJA KSILANA IZ LJUSKE ORAHA

*Petra Miškec, 782/PI*

**Sažetak:** U skladu s povećanjem količine otpadne biljne biomase, znanstvenici, ali i stručnjaci iz različitih grana industrije, uočili su potencijal iskorištavanja agro-industrijskog otpada kao izvora različitih visokovrijednih sastojaka. Cilj ovoga rada je izdvajanje ksilana iz ljuske oraha, kao i njegova karakterizacija u svrhu ispitivanja potencijala za daljnju upotrebu. U tu svrhu praćen je utjecaj delignifikacije (2 h i 4 h) te vremena i koncentracije lužine (2 M i 4 M) tijekom alkalne ekstrakcije. Primjenjenim postupcima izdvojene su tri frakcije (topljiva i netopljiva hemiceluloza te celulozni ostatak) u kojima je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz prethodnu PMP-derivatizaciju određen monomerni sastav. Gotovo 53 % suhe tvari sirovine čine strukturni polisaharidi, u čijem sastavu dominiraju ksiloza i glukoza, odnosno ukupni gluklan i ukupni ksilan. Udjel ukupnog ksilana u ljusci oraha iznosi 19,9 %, što je 38 % polisaharidne suhe tvari. Iskorištenje ksilana u topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj frakciji, izraženo kao postotak inicijalno prisutnog ksilana u originalnom uzorku, iznosi oko 100 % u svim uzorcima. Prethodnom delignifikacijom uzoraka poboljšana je ekstrakcija ksilana, dok koncentracija lužine te vrijeme trajanja alkalne ekstrakcije nisu imali značajan utjecaj na ekstrakciju ksilana. Ljuska oraha je dobar izvor ksilana, koji se većim dijelom odvaja u topljivoj hemiceluloznoj frakciji.

**Ključne riječi:** frakcijsko izdvajanje, hemiceluloza, iskorištenje, ksilan, ljuska oraha

**Rad sadrži:** 52 stranica, 12 slika, 3 tablice, 99 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Draženka Komes

**Pomoć pri izradi:** Aleksandra Vojvodić Cebin, dipl. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. Prof. dr. sc. Draženka Komes
3. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. Prof. dr. sc. Nada Vahčić (zamjena)

**Datum obrane:** 28. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF XYLAN FROM WALNUT SHELL

*Petra Miškec, 782/PI*

**Abstract:** In accordance with the rising amount of vegetable biomass waste, scientists and experts from different branches of industry have noticed the potential for agro-industrial waste utilization and its use as a secondary raw material. The aim of this study was the extraction of xylan from walnut shell, as well as its characterization in order to examine its potential for further utilization. For this purpose, the effect of previous delignification (2 h and 4 h), time and alkaline concentration (2 M and 4 M) was observed during alkaline extraction. Three fractions were isolated using different extraction conditions (the soluble and the insoluble hemicellulose and the cellulose residue) in which it was determined monomeric composition using high performance liquid chromatography (HPLC) with previous PMP derivatization. Almost 53 % of the dry matter of the raw material (walnut shell) is composed of structural polysaccharides, whose composition is dominated by xylose and glucose (total glucan and total xylan). The share of xylan in walnut shell is 19,9 %, which is around 38 % of the carbohydrate portion of structural polysaccharides. The utilization of xylan in the soluble and the insoluble hemicellulose fraction, expressed as % of the initially present xylan in the raw material, is approximately 100 % in all samples. Previous delignification of the samples improved the xylan extraction, while alkaline concentration and duration of alkaline extraction did not have a significant effect on xylan extraction. Walnut shell is a good source of xylan, which is mostly separated in a soluble hemicellulose fraction.

**Key words:** fraction separation, hemicellulose, utilization, xylan, walnut shell

**Thesis contains:** 52 pages, 12 figures, 3 table, 99 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Draženka Komes, Full Professor

**Technical support and assistance:** Aleksandra Vojvodić Cebin, BSc.

#### Reviewers:

1. PhD Božidar Šantek, Full Professor
2. PhD Draženka Komes, Full Professor
3. PhD Ksenija Marković, Associate Professor
4. PhD Nada Vahčić, Full Professor (replacement)

**Thesis defended:** 28<sup>th</sup> September 2017

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	3
2.1. Potencijal agro-industrijskog otpada kao sekundarne biljne sirovine	3
2.2. Ksilooligosaharidi iz lignocelulozne sirovine	4
2.2.1. Kemijska struktura ksilooligosaharida	5
2.2.2. Utjecaj ksilooligosaharida na ljudsko zdravlje	6
2.3. Metode izdvajanja ksilooligosaharida	7
2.3.1. Predtretmani za ekstrakciju ksilana	7
2.3.1.1. Autohidroliza	8
2.3.1.2. Alkalna i kiselinska predhidroliza	9
2.3.1.3. Enzimski tretman predhidroliziranih lignoceluloznih sirovina i dobivanje ksilooligosaharida	9
2.3.1.3.1. Ksilanaze	10
2.4. Enzimska hidroliza predtretirane lignocelulozne sirovine	11
2.5. Pročišćavanje ksilooligosaharida	11
2.6. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u analizi hemiceluloze	12
2.7. Ljuska oraha	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	15
3.1. Materijal	15
3.1.1. Biljna sirovina	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.2.1. Ekstrakcija hemiceluloze	15
3.1.2.2. Određivanje monomernog sastava polisaharidnih frakcija	16
3.1.3. Oprema i uređaji	17
3.1.3.1. Ekstrakcija hemiceluloze	17
3.1.3.2. Određivanje monomernog sastava polisaharidnih frakcija	18
3.2. Metode rada	19
3.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari	19
3.2.2. Depektinizacija razrijeđenom kiselinom	20
3.2.3. Delignifikacija natrijevim kloritom i octenom kiselinom	21
3.2.4. Alkalna ekstrakcija hemiceluloze iz holoceluloze	23
3.2.5. Dijaliza i sušenje izdvojenih polisaharidnih frakcija	24
3.2.6. Potpuna kiselinska hidroliza polisaharidnih uzoraka	27
3.2.7. Priprema 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) derivata	29
3.2.8. Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	32
4.1. Analiza monomernog sastava polisaharidnih frakcija ljuske oraha	32
4.2. Analiza gubitka suhe tvari tijekom pojedinih postupaka ekstrakcije ksilana iz ljuske oraha	34
4.3. Analiza prinosa ksilanskih frakcija ljuske oraha	36

4.4. Bilance polisaharidnih frakcija ljuske oraha .....	41
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>45</b>

# 1. UVOD

U procesu industrijske proizvodnje hrane iz primarnih sirovina dolazi do zaostajanja nusproizvoda (agro-otpad) koji nisu namijenjeni izravnoj konzumaciji (nejestivi dijelovi) te kao takvi predstavljaju ekološki, ali i ekonomski problem (Laufenberg i sur., 2003). Iako su se u prošlosti upotrebljavali samo kao stočna hrana ili prirodno gnojivo (Montgomery, 2004), u današnje se vrijeme uvelike razmatra upotreba i prerada tih nusproizvoda, budući da predstavljaju značajan izvor funkcionalnih komponenata (Carle i sur., 2001), među kojima se ističu ugljikohidrati (Montgomery, 2004), posebice polisaharidi, koji se se mogu koristiti kao emulgatori, stabilizatori i zgušnjivači hrane (Nobre i sur., 2015). Danas se sve više ističu funkcionalni učinci biljnih polisaharida te se isti koriste i kao zamjene za masti i šećere u proizvodima smanjene energetske vrijednosti, ali i u svrhu povećanja vrijednosti prehrambenih proizvoda, čijom se konzumacijom ostvaruju pozitivni zdravstveni učinci, primjerice na gastrointestinalni sustav (Nobre i sur., 2015). U tom pogledu posebno je zanimljiva struktura koju čine: celuloza, hemiceluloza te lignin, pri čemu na hemicelulozu otpada do 40 % suhe tvari. Primjeri lignocelulozne sirovine su: ljuska badema, ljuska oraha, šećerna trska, mahuna graška i ostale (Cravo i sur., 2017). Hemiceluloza je zanimljiva zbog ksilana koji dominira u njezinom sastavu, a njegovom preradom i daljnjom upotrebom dobivaju se visokovrijedni sastojci (Otieno i Ahrid, 2012). Ksilooligosaharidi su oligomeri ksiloze povezani  $\beta$ -1,4-vezama i supstituentima poput acetila, fenolnih i uronskih kiselina (Singh i sur., 2014). Uloga ksilooligosaharida je stimulativni rast i aktivnost specifičnih grupa bakterija (Immerzeel i sur., 2014) za koje je dokazano da poboljšavaju zdravlje, smanjuju infekcije crijeva te preventivno djeluju na pojavu raka debelog crijeva (Macfarlane i sur., 2006). Uloga ksilooligosaharida kao prebiotika je izvanredna budući da povećavaju sposobnost apsorpcije kalcija u crijevima, imaju pozitivan učinak na oboljele od dijabetesa tipa II te je bitna njihova uloga kao antioksidansa (Jain i sur., 2015). Dobrim izvorom ksilana, tj. ksilooligosaharida smatraju se lignocelulozne sirovine, biomasa koje ima u velikim količinama, te koja zauzima gotovo 70 % ukupne biomase iz biljaka (Percival-Zhang, 2008). S obzirom na dostupnost sirovine i nedostatak istraživanja, ljuska oraha je zanimljiv materijal za izdvajanje i karakterizaciju ksilana.

Sukladno navedenome, cilj ovoga rada je izdvajanje i karakterizacija ksilana iz ljuske oraha. U tu svrhu, ispitat će se utjecaj delignifikacije i parametara koji su mijenjani tijekom alkalne ekstrakcije (vrijeme trajanja te koncentracija lužine) na prinos ksilana. Primjenom HPLC



metode, uz prethodnu PMP derivatizaciju, odredit će se monomerni sastav ksilanskih frakcija. Navedenim postupcima ispitat će se potencijal hemicelulozne frakcije ljuske oraha za njezino daljnje korištenje.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. POTENCIJAL AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA KAO SEKUNDARNE BILJNE SIROVINE**

Povećanjem svjetske populacije (Otles, 2011), sve je veća potreba za hranom, a proizvodnjom prehrambenih proizvoda biljnoga podrijetla, nastaju veće količine agro-industrijskog otpada, koji predstavlja veliki ekološki problem te zahtijeva adekvatno zbrinjavanje i/ili preradu (Misi i Forster, 2002). Tradicionalni načini zbrinjavanja otpada podrazumijevaju njegovu preradu u različite oblike stočne hrane ili gnojiva (Schieber i sur., 2001).

Međutim, budući da agro-otpad sadrži mnoge korisne spojeve te je bogat različitim nutrijentima (da Silva i Jorge, 2014), u novije vrijeme njegova prerada omogućuje i iskorištavanje „korisnih“ spojeva i/ili proizvodnju novih proizvoda s većom tržišnom vrijednošću te doprinosi smanjenju početne količine otpadne biomase (Galanakis, 2012), što u konačnici povećava razinu iskorištenja primarne sirovine. U tom pogledu važan je udjel teških metala, energetska vrijednost, mirisi nastali razgradnjom otpada, dostupnost i troškovi transporta (Westerman i sur., 2005). Kako se proučavanju agro-industrijskog otpada, kao vrijedne sirovine, pristupilo intenzivnije u posljednjem desetljeću, potrebna su još brojna istraživanja stručnjaka iz različitih područja znanosti (prehrambeni tehnolozi, kemičari, nutricionisti i sl.). U prilog tome ide i publicirana literatura koja obrađuje opisanu problematiku i koja se povećava iz dana u dan.

Stručnjaci, kao i sami potrošači, okreću se proučavanju zdravijeg načina života i zdravijim oblicima prehrane koja uključuje sastojke prirodnog podrijetla (Heerera i sur., 2016). Sekundarne biljne sirovine dobar su izvor prehrambenih vlakana, koja se mogu koristiti kao funkcionalni sastojci za poboljšanje strukturnih svojstava, kao što su vezanje i zadržavanje vode, povećanje viskoznosti, poboljšanje teksture i senzorskih svojstava te produljenje roka trajanja (Elleuch i sur., 2011). Topljiva vlakna, poput pektina, mogu se koristiti kao sredstva za želiranje ili kao zamjene za masti u nekim proizvodima (Galanakis i sur., 2010), dok se netopljiva vlakna, poput hemiceluloze, mogu koristiti za obogaćivanje prehrambenih proizvoda u svrhu poboljšanja rada gastrointestinalnog sustava (Rodriguez i sur., 2006). U novije vrijeme sve je veći interes za izdvajanjem oligosaharida iz ksilanskih i pektinskih sirovina zbog njihovog potencijalnog prebiotičkog učinka (Jain i sur., 2015).

Osim za proizvodnju hrane, agro-industrijski otpad ima ulogu i u proizvodnji biogoriva. Značajan porast potrošnje obnovljivih izvora energije (nafta, ugljen i prirodni plin) zbog ubrzanog razvoja svjetskog gospodarstva uzrokuje brže iscrpljivanje njihovih zaliha i povećanje emisije stakleničkih plinova. Nestabilna cijena goriva i petrokemijskih sirovina te potreba za sigurnijom dobavom energije pridonijeli su povećanju proizvodnje alternativnih goriva, tzv. biogoriva. Biogoriva se dobivaju preradom obnovljivih izvora energije, odnosno biomase (Ivančić Šantek i sur., 2016).

## **2.2. KSILOOLIGOSAHARIDI IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA**

U današnje vrijeme, najveći je izazov povećati proizvodnju „zdrave“ i ekonomski prihvatljive hrane koja bi bila dostupna svjetskoj populaciji. Povećanjem proizvodnje hrane mora se paziti da ne dođe do osiromašivanja novih područja te se u tu svrhu okreće iskorištavanju agro-industrijskog otpada. U tom pogledu se sve više ispituje potencijal agro-industrijskog otpada lignocelulozne sirovine čija se količina, na godišnjoj razini, mjeri u milijardama tona (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

U svrhu očuvanja energije, ostaci šećerne trske koriste se u tvornicama za generiranje pare, zagrijavanje soka šećerne trske te za pogon mlinova. Međutim, određena se količina ostataka šećerne trske koristi za proizvodnju visokovrijednih proizvoda (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

Ostaci šećerne trske sadrže od 24 do 29 % hemiceluloze, pri čemu je 1-arabino-(4-O-metil-D-glukurono)-D-ksilan zastupljen u najvećoj mjeri, a slijede ga celuloza, lignin, mineralne tvari, voskovi i ostale komponente (Brienzo i sur., 2009). Hemiceluloze su heteropolisaharidi čiji je glavni konstituent ksilan, a sadrže i ksilozu, arabinozu, galaktozu, manozu i glukozu (Garrote i sur., 1999).

Ostale lignocelulozne sirovine, kao što su stabljika duhana, pamuka, suncokreta i pšenice, također sadrže visoke udjele ksilana (19-21 %), celuloze (33-44 %) te lignina (20-29 %) (Akpınar i sur., 2009a,b).

Istraživanjem kemijskog sastava kukuruznog klipa, zabilježeno je da ova sirovina sadrži visoke udjele glukana (31-35 %), lignina (10-14%) te visoke udjele ksilana (30-35%) (Tan i sur., 2008).

Lignocelulozne sirovine bogat su izvor celuloze i hemiceluloze. Ksilan se koristi u tehnologijama za proizvodnju alkohola, ksiloze, ksilitola i ksilooligosaharida (Azevedo Carvalho i sur., 2013). Ksilooligosaharidi, nespecifični oligosaharidi, sastavljeni su od dvije

do deset molekule ksiloze povezane  $\beta$ -1-4 vezama (Mäkeläinen i sur., 2010). Ksilooligosaharidi se dobivaju hidrolizom ksilana (Nabarlantz i sur., 2007) i upravo je posljednjih godina povećan interes za prebioticima pri čemu se velika pažnja pridaje ksilooligosaharidima kao potencijalnim prebioticima. U prodaji se nalaze u obliku bijelog praha (Mäkeläinen i sur., 2010), smatraju se neprobavljivim oligosaharidima te za ljudski organizam imaju važna biološka svojstva. Koriste se kao dijetetska sladila u niskokaloričnoj prehrani i prehrani oboljelih od šećerne bolesti (Choque Delgado i sur., 2011). U odnosu na druge oligosaharide (Rycroft i sur., 2001; Samanta i sur., 2012), ksilooligosaharidi bolje stimuliraju aktivnost bifidobakterija (Tuohy i sur., 2005).

Zabranom upotrebe antibiotika za stimulaciju rasta životinja (svinja, kokoši, stoke i kućnih ljubimaca), Europska Unija je, uz postojeće prebiotike (fruktooligosaharide i mananoligosaharide) stavila izazov u pronalaženju molekula s još boljim prebiotičkim karakteristikama, a molekulama s dobrim prebiotičkim svojstvima pokazali su se ksilooligosaharidi (Olano-Martin i sur., 2002).

Dobivanje ksiloogohsaharida iz lignoceluloznih sirovina odvija se u dvije faze; prva faza uključuje kemijski predtretman (autohidrolizu, kiselinsku i alkalnu predhidrolizu) kako bi se ekstrahirao ksilan, a druga faza enzimsku ili kiselinsku hidrolizu ksilana (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

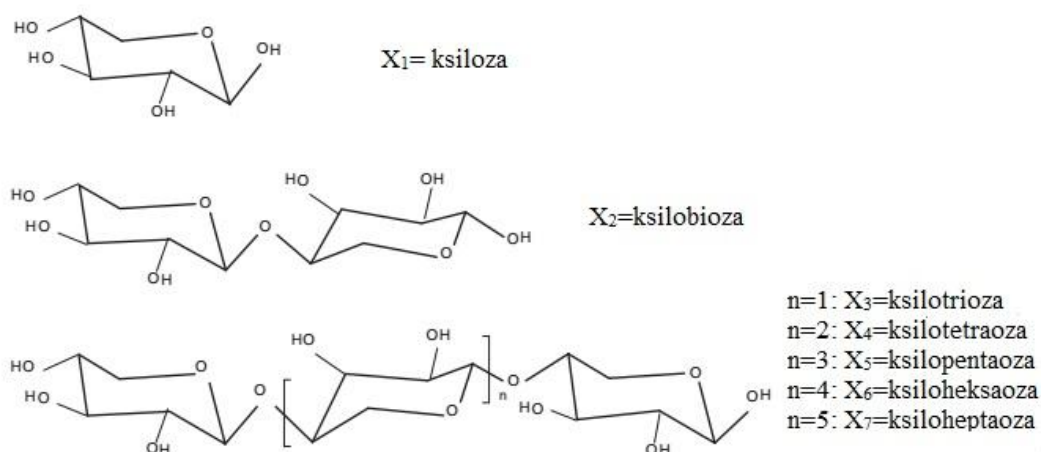
### 2.2.1. Kemijska struktura ksilooligosaharida

Ksilooligosaharidi se sastoje od 2 do 10 molekula ksiloze (Slika 1). Kemijska stabilnost ovisi o tipu oligosaharida, vrstama veza, anomernoj konfiguraciji, itd. (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

Iako su  $\beta$ -veze čvrste, većina oligosaharida može biti hidrolizirana, što rezultira gubitkom nutritivnih vrijednosti (pri  $\text{pH} < 4$  te povišenoj temperaturi).

Ksilooligosaharidi su stabilni u širokom rasponu pH vrijednosti (2,5-8) i temperaturama do 100 °C što predstavlja prednost u odnosu na ostale neprobavljive oligosaharide (Bhat, 1998).

Ksilooligosaharidi imaju mnogo pozitivnih karakteristika, između kojih se ističu stabilnost pri kiselom pH, toplinska otpornost i netoksičnost (Vasquez i sur., 2000).



**Slika 1.** Shematski prikaz strukture ksiloze i ksilooligosaharida (Azevedo Carvalho i sur., 2013)

### 2.2.2. Utjecaj ksilooligosaharida na ljudsko zdravlje

Ljudski organizam ne može probaviti ksilooligosaharide, budući da nema enzime potrebne za hidrolizu  $\beta$ -veza te se zato smatraju prebioticima i topljivim vlaknima koja ne podliježu degradaciji djelovanjem želučane kiseline.

Biološka aktivnost ksilooligosaharida ovisi o molekulskoj masi (Hughes i sur., 2007), te oni koji sadrže manje od 4 monomerne jedinice imaju ulogu prebiotika, budući da potiču umnažanje bifidobakterija (Gullon i sur., 2008).

Kao aktivni sastojci funkcionalne hrane, imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje (Nabarlatz i sur., 2007): poboljšavaju funkciju crijeva, apsorbiraju kalcij te metabolizam lipida, preveniraju karijes, štite od kardiovaskularnih bolesti te smanjuju rizik od raka debelog crijeva (Grootaert i sur., 2007; Wang i sur., 2009). Studije ukazuju da se konzumacijom 4 g ksilooligosaharida dnevno tijekom 3 tjedna poboljšava crijeva mikroflora kod osoba starijih od 65 godina (Chung i sur., 2007).

Poticanjem rasta bifidobakterija, iste inhibiraju rast patogenih bakterija (Mussato i Mancilha, 2007). Ksilooligosaharidi imaju blagotvoran učinak na kožu, krv, imunološki sustav te djeluju antioksidativno i antialergijski (Aachary i Prapulla, 2009).

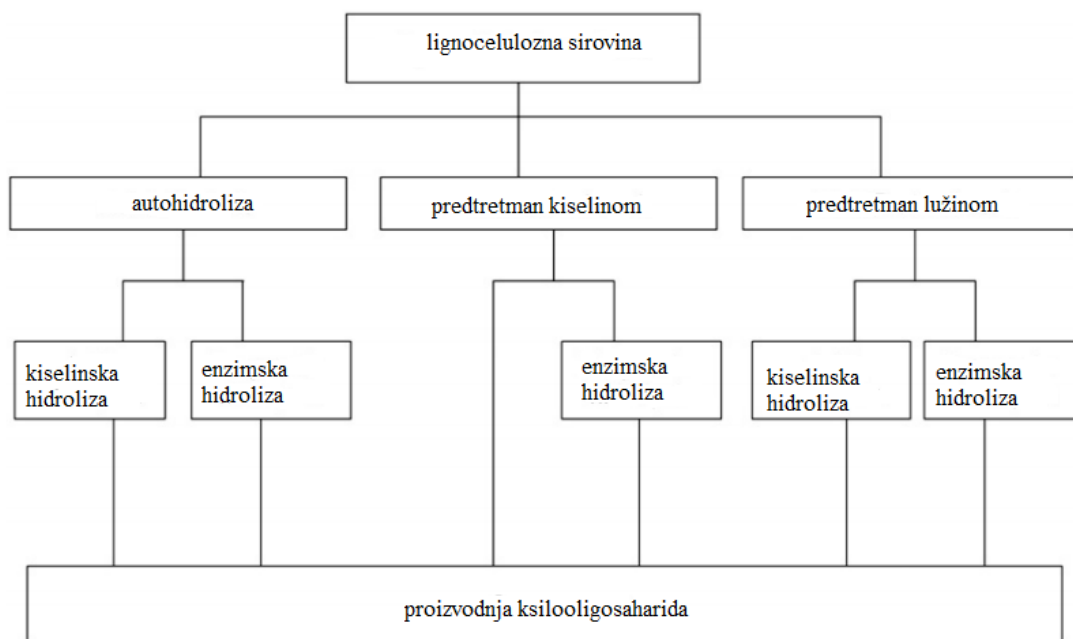
## 2.3. METODE IZDVAJANJA KSILOOLIGOSAHARIDA

### 2.3.1. Predtretmani za ekstrakciju ksilana

Predtretmani uključuju različite termičke i kemijske metode kojima se olakšava izdvajanje ksiloooligosaharida (Aachary i Prapulla, 2009). Tako se primjerice za izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari (pektin, voskovi), koristi etanol ili etil-acetat (Brienzo i sur., 2009).

Alkoholi i ketoni mogu se koristiti za koncentriranje izdvojenih ksiloooligosaharida (Akpinar i sur., 2009).

Ostale metode koje se trenutno koriste kao predtretmani su: autohidroliza, kiselinska ili alkalna predhidroliza te enzimaska hidroliza (Slika 2).



**Slika 2.** Mogući načini predhidrolize i hidrolize (kiselinska ili enzimaska hidroliza) u cilju dobivanja ksiloooligosaharida iz lignoceluloznih sirovina (Azevedo Carvalho i sur., 2013)

### 2.3.1.1. Autohidroliza

Autohidroliza, poznata kao i hidrotermoliza, je nekemijski proces deacetilacije D-ksilana uz prisutstvo vode pri povišenoj temperaturi. Provodi se u kiselim uvjetima ( $\text{pH} \leq 4$ ) uslijed djelomičnog cijepanja acetilnih grupa nastaje octena kiselina. Tijekom autohidrolize, polimerna hemiceluloza razgrađuje se do ksilooligosaharida koji se dalje cijepaju do monomera-ksiloze (Jain i sur., 2015).

Ligero i suradnici (2011) razvili su metodu za dobivanje ksilooligosaharida iz biljke *Mischantus giganteus* te su variranjem temperature (160–200 °C) i vremena trajanja reakcije (15-60 min) ustanovili da se maksimalni prinos ksilooligosaharida iz te biljke ostvaruje pri temperaturi od 160 °C u vremenu od 60 minuta.

Serijom autohidroliza dobiva se niži prinos hemiceluloze, budući da dolazi do repolimerizacije lignina i ksilana, što otežava dobivanje ksilooligosaharida hidrolizom ksilana (Jain i sur., 2015).

Po završetku autohidrolize, potrebno je dodatno pročititi uzorke, budući da produkti lignoceluloznih sirovina mogu sadržavati nepoželjne sastojke kao što su lignin, furfural, monosaharidi i slično (Zhu i sur., 2006).

Ksilooligosaharidi izdvojeni autohidrolizom sadrže visoke udjele spojeva s visokim stupnjem polimerizacije (Nabarlatz i sur., 2007).

Autohidroliza je prvi korak u frakcijskom izdvajanju ksilana iz lignoceluloznih sirovina (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

Nakon predhidrolize, dobivena smjesa može se razdvojiti na dvije frakcije. Topljiva i tekuća frakcija bogata je hemicelulozom te se može prevesti u visokovrijedne produkte, kao što su topljivi oligosaharidi, šećeri i aldehidi. Precipitirani ostatak sadrži visoki udjel celuloze i lignina, koji se mogu odvojiti i koristiti u proizvodnji fermentabilnih šećera ili goriva (Yanez i sur., 2006).

Kada se lignocelulozna sirovina, koja sadrži ksilan, podvrgne autohidrolizi u blagim uvjetima, glavni produkti koji nastaju su ksilooligosaharidi. Kako bi dobiveni ksilooligosaharidi zadržali 2-6 ksiloznih jedinica, potrebno je provesti enzimsku ili kiselinsku hidrolizu (Moure i sur., 2006).

Autohidroliza zahtijeva specijaliziranu opremu koja radi pri visokim temperaturama (Zhu i sur., 2006).

### 2.3.1.2. Alkalna i kiselinska predhidroliza

Enzimskoj hidrolizi hemiceluloze prethode tretmani s kiselinom ili lužinom (Slika 2) koji trebaju biti provedeni pri blagim uvjetima, kako bi se ograničio gubitak ksiloze oslobođene djelovanjem kiseline (Yang i sur., 2005).

Istraživanja provedena na klipu kukuruza pokazuju da predtretman kiselinom ne utječe na ksilan-lignin kompleks, ali naknadnom primjenom više temperature dolazi do promjene istoga (Yang i sur., 2005).

Učinkovitost predtretmana procjenjuje se na temelju udjela ksilana nakon predtretmana te količine ksilooligosaharida koji mogu biti proizvedeni pri određenim uvjetima (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

Rezultati istraživanja na stabljici duhana Akpinara i suradnika (2010) sugeriraju da alkalna predhidroliza dovodi do većih prinosa ksilana, a time i ksilooligosaharida, u odnosu na kiselinsku predhidrolizu.

Glavni nedostatak alkalne ekstrakcije je gubitak acetilnih skupina prisutnih u ksilanu, što rezultira smanjenom topljivošću ksilooligosaharida u vodi (Nabarlatz i sur., 2007).

Kako bi ksilan bio dostupniji djelovanju ksilanaza, do sada su se ispitivale različite metode predtretmana. Tako je u radu Aacharya i Prapulla na klipu kukuruza (2009) prinos ksilana ekstrahiranog bez predtretmana iznosio oko 32 %, a onog ekstrahiranog uz predtretman 40 %. Ovi rezultati opravdavaju upotrebu predtretmana, prije upotrebe ksilanaza, budući da je zabilježen porast prinosa ksilana za 18 %.

Kombinacijom alkalne, kiselinske predhidrolize, parom (135 °C, 30 minuta) te enzimskom hidrolizom ksilanazama, prinosi ksilooligosaharida dosegli su vrijednosti od 89 % (Aachary i Prapulla, 2009).

U radu Akpinara i suradnika (2009) ispitivan je utjecaj različitih koncentracija kiseline (1,22 %-4,9 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) za dobivanje ksilooligosaharida iz lignoceluloznih sirovina (stabljika duhana, pamuka, suncokreta i pšenice). Najboljim uvjetima kiselinske predhidrolize pokazala se koncentracija 2,45 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  u trajanju od 30 minuta pri temperaturi od 100 °C. Ipak, pri ovim uvjetima prinos ksilooligosaharida je za ispitivane sirovine i dalje bio vrlo nizak.

Otieno i Ahring (2012) u svome su radu promatrali prinos ksilooligosaharida iz prosa (*Panicum virgatum*-84.1%), kineskog šaša (*Miscanthus sinensis*-64.9%) i šećerne trske (92,2 %) koristeći termo-kiselinski tretman (0.1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 145 °C, 1 h).

Upotrebom termo-kiselinskog tretmana na šećernoj trsci prinos ksilooligosaharida je visokih 92 % (Brienzo i sur., 2010).



Veliki nedostatak kiselinske predhidrolize je nastajanje toksičnih komponenti, kao što je furfural, koji zahtijeva veći stupanj pročišćavanja (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

S obzirom na prinos ksilooligosaharida, najbolji predtretman je alkalna predhidroliza (Aachary i Prapulla, 2009).

Tip i kemijska struktura supstrata kao i specifičnost enzima bitni su faktori prilikom enzimske hidrolize ksilana za proizvodnju ksilooligosaharida (Apkinar i sur., 2010).

### 2.3.1.3. Enzimski tretman predhidrolizirane lignocelulozne sirovine i dobivanje ksilooligosaharida

#### 2.3.1.3.1. Ksilanaze

Različiti mikroorganizmi, kao što su bakterije iz rodova: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Phanerochaetes*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Clostridium*, *Bacillus* i *Thermoascus* proizvode enzime ksilanaze iz agro-industrijskih ostataka (Gomes i sur., 2007). Neke gljive također proizvode ksilanaze, ali istovremeno luče i celulaze koje utječu na kvalitetu i čistoću nastalih produkata (Balakrishnan i sur., 1992).

Supstrati koji dovode do maksimalne ekstrakcije ksilana za proizvodnju ksilooligosaharida kao ni mikroorganizmi koji proizvode ksilanaze još nisu u potpunosti okarakterizirani (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

Hemiceluloza je heteropolimer složene strukture u kojoj prevladava ksilan, za čiju je potpunu hidrolizu potrebna aktivnost enzima (Biely, 1985).

Endo- $\beta$ -1,4-ksilanaze važne su za depolimerizaciju ksilana, pri čemu djeluju na glavni lanac i oslobađajući oligosaharide. Ksilanaze su posebno važne za dobivanje visokovrijednih ksilooligosaharida (Vasquez i sur., 2000).

$\beta$ -1,4-ksilanksilohidrolaze djeluju na nereducirajući kraj ksilobioze oslobađajući monomere ksiloze (Biely, 1985).

Potražnja za enzimskim tretmanima u industrijskoj proizvodnji u današnje vrijeme ubrzano raste, međutim, ograničavajući faktori su troškovi proizvodnje i niski prinosi (Song i Wei, 2010).

## 2.4. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDTRETIRANE LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Po završetku predtretmana lignocelulozne sirovine, potrebno je provesti enzimsku (Ai i sur., 2005; Akpinar i sur., 2009; Brienzo i sur., 2010; Carvalho i sur., 2012; Yang i sur., 2011) ili kiselinu hidrolizu u svrhu ekstrakcije ksilana (Akpinar i sur., 2010; Rodriguez i sur., 2010).

Dobivanje ksiloooligosaharida direktnom enzimskom hidrolizom je poželjno, zbog specifičnosti enzima i nastajanja male količine nepoželjnih produkata (Jain i sur., 2015).

Djelovanjem ksilanaza, koje hidroliziraju  $\beta$ -1,4-veze ksilana nastaju ksiloooligosaharidi. U svrhu povećanja prinosa ksiloooligosaharida potrebno je upotrijebiti endoksilanaze koje hidroliziraju  $\beta$ -1,4-veze glavnoga lanca ksilana (Aachary i Prapulla, 2009; Akpinar i sur., 2010).

Prilikom enzimske hidrolize, enzimi se mogu dodati direktno u reakcijski medij (Akpinar i sur., 2010), mogu biti imobilizirani (Jiang i sur., 2004), proizvedeni pomoću mikroorganizama ili imobilizirani unutar biomase (Dorta i sur., 2006).

Praćenjem reakcija kataliziranih imobiliziranim i slobodnim endoksilanazama iz *Bacillus halodurans*, za proizvodnju ksiloooligosaharida iz klipa kukuruza (50 °C, pH 8,0, 2 % supstrata tijekom 24 h), pokazalo se da su slobodne endoksilanaze efikasnije u proizvodnji ksiloooligosaharida. Slobodni enzim je preveo ksilan u oligomere s većim stupnjem polimerizacije (stupanj polimerizacije >4), što upućuje na djelovanje slobodnih enzima na dužem (netopljivom) i kraćem (topljivom) kraju ksilanskog lanca (Lin i sur., 2011).

Na sam prinos ksiloooligosaharida utječu različiti parametri, kao što su: tip upotrijebljene ksilanaze, sastav ksilana, način predtretmana, vrijeme trajanja enzimske hidrolize i dr. (Azevedo Carvalho i sur., 2013).

## 2.5. PROČIŠĆAVANJE KSILOOLIGOSAHARIDA

Kako bi ksiloooligosaharidi našli primjenu u prehrani kao funkcionalni sastojci, potrebno ih je, nakon ekstrakcije, pročistiti od monosaharida i drugih nepolisaharidnih komponenti (Jain i sur., 2015). Stupanj čistoće ksiloooligosaharida ovisi o otapalu koje se koristi za ekstrakciju, a to su najčešće etanol, aceton i izopropanol (Vegas i sur., 2005; Swennen i sur., 2005).

Pročišćavanje ksilooligosaharida provodi se adsorpcijom na aktivnoj površini u kombinaciji s eluiranjem otapalom. Najčešće korišteni adsorbensi su: aktivni ugljen, bentonit, diatomejska zemlja, porozni sintetski materijali i dr. (Vasquez i sur., 2000).

Kromatografske metode korištene za pročišćavanje ksilooligosaharida su: gel permeacijska kromatografija-GPC (Sun i sur., 2002), gel-filtracija-SEC (Jacobs i sur., 2003), te ionska kromatografija-IEC (Vegas i sur., 2005) te membranska separacija (ultrafiltracija i nanofiltracija) (Qing i sur., 2013).

Prednosti ove tehnike su mala potrošnja energije te lako upravljanje operacijskim varijablama (Meyer i sur., 2009; Cano i Palet, 2007; Yuan i sur., 2004; Nabarlatz i sur., 2007; Gullon i sur., 2008).

## **2.6. PRIMJENA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI U ANALIZI HEMICELULOZE**

Kromatografija je tehnika koja služi za razdvajanje složenih uzoraka na sastavne komponente u cilju analize, identifikacije, pročišćavanja i/ili određivanja udjela pojedinih sastojaka u uzorku. Učestalo se primjenjuje u farmaceutskoj, prehrambenoj i naftnoj industriji te medicini i drugim područjima. Priprema uzoraka za analizu te sama analiza ugljikohidrata predstavljaju izazov zbog velikog broja izomera, različite strukture monosaharida (otvoreni ili zatvoreni prsten, različita veličina i konformacija prstena), razgranatost oligosaharida, nedostatka kromofora ili fluorofora (Lamari i sur., 2003; Sanz i Martinez-Castro, 2007; Harvey, 2011).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) prihvaćena je kao jedna od glavnih tehnika analize šećera. Iako ne daje uvid u njihovu strukturu, osigurava visoku specifičnost i osjetljivost (što je naročito važno kada su ugljikohidrati prisutni u malim udjelima) te smanjenu mogućnost interferencija.

Nedostaci HPLC metode su visoka cijena opreme, ali i složena priprema uzoraka (Hall, 2007). HPLC metoda predstavlja brz, ponovljiv i točan analitički pristup separacije različitih ugljikohidrata. Analiza ugljikohidrata primjenom HPLC-a, ili druge separacijske tehnike povezane UV detektorom, otežana je zbog nedostatka kromofora ili fluorofora u molekulama šećera (Suzuki i sur., 1996; Hase, 1995). U ranijim analizama s UV detekcijom korištene su valne duljine od 190-210 nm (Hase, 1995), ali je pritom intenzitet signala vrlo nizak te postoji velika mogućnost interferencije šumova te je zato HPLC-UV tehnika rijetko korištena. Prilikom detekcije češće se koriste optička svojstva molekula šećera, tj. detektori koji rade na

na principu mjerenja promjene indeksa loma prilikom prolaska analita, odnosno refrakcijski detektori (RID- engl. *Refractive Index Detector*).

Nepoželjne karakteristike ovih detektora su osjetljivost na promjene u sastavu otapala te promjene temperature i tlaka (Shen i Perreault, 1998).

Nederivatizirani šećeri su hidrofilni te imaju približno sličnu strukturu, stoga postoje ograničenja u separaciji složenih smjesa, budući da slično interferiraju bilo sa stacionarnom ili mobilnom fazom (Shen i Perreault, 1998). Primjenom derivatizacije, molekule šećera postaju pogodnije za analizu, čime se olakšava njihova separacija i detekcija. Jedan od načina derivatizacije je „označavanje“ šećera aromatskim skupinama, čime nastali derivat postaje hidrofoban i time se omogućuje primjena kromatografije obrnutih faza (Shen i Perreault, 1998). Pri tome se koriste standardne nepolarne kolone, poput C18 kolona, koje su jeftinije od specifičnih kolona za izravnu analizu monosaharida.

Kako bi se monosaharidi mogli detektirati HPLC-om, potrebno ih je „označiti“, što postiže različitim reagensima: DNPO (2,4-dinitrofeniloktilamin), OPA (O-filaldialdehid), NAIM (naftimidazol) (Harvey, 2011), 2-aminobenzojevom kiselinom ili 3-metil-1-fenil-5-pirozolin-2-onom (PMP-om). Šećeri „označeni“ 2-aminobenzojevom kiselinom eluiraju u zadnjem dijelu kromatograma, dok su šećeri „označeni“ PMP-om distribuirani kroz cijeli kromatogram.

U tu svrhu najčešće se koristi reagens 3-metil-1-fenil-5-pirozolin-2-on (PMP) (Stepan i Staudacher, 2011). PMP reagens stupa u reakcije s reducirajućim ugljikohidratima i pritom ne izaziva promjene na molekuli šećera (Zhang i sur., 2003), što rezultira apsorpcijom pri 245 nm te se omogućuje dobra detekcija na C18 HPLC koloni (Harvey, 2011).

## 2.7. LJUSKA ORAHA

Orah (*Juglans regia* L.) je najstarije kultivirano voće u svijetu (Sen, 1986). Najveći proizvođači oraha su: Kina s proizvodnjom od 3,5 milijuna tona za 2016. godinu, Iran i SAD dijele drugo mjesto s proizvodnjom oko 450 tisuća tona godišnje, te ih slijede Turska, Ukrajina i Meksiko s približno 200 tisuća tona. Osim za proizvodnju goriva, ljuska oraha koristi se i u kozmetičkoj industriji te različitim granama medicine (Fernandez-Aulloo i sur., 2013). Plod oraha ima visoku nutritivnu i ekonomsku vrijednost. Pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje, zbog sastava polinezasićenih masnih kiselina (posebice linolne i  $\alpha$ -linolenske) te zbog sadržaja proteina (Savage, 2001). Prerađena ljuska oraha (Slika 3) koristi se u industriji u različite svrhe—kao zgušnjivač u industriji boja i plastike, punilo kod

eksploziva te kao abraziv. Često se ljuska oraha koristi kao ogrjevni materijal ili ukras u cvjećarstvu. U novije vrijeme koristi se i kao pročišćivač otopina od teških metala (Saadat i Karimi-Jashni, 2011; Wolfova i sur., 2013).



**Slika 3.** Ljuska oraha (Anonymous 1)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Biljna sirovina

U ovom radu korištena je vanjska tvrda ljuska ploda oraha (*Juglans regia*) (u daljnjem tekstu **ljuska oraha**, engl. *walnut shell* - WS), nusproizvod koji se dobiva čišćenjem ploda, odnosno izdvajanjem jezgre oraha koja se koristi za prehranu ili dobivanje ulja. Ljuska oraha dobivena je od lokalnih malih uzgajivača oraha. Sirovina je prirodno niskog udjela vlage što je čini mikrobiološki stabilnom te nije bilo potrebno provoditi naknadno dosušivanje. Sirovina je prvo grubo usitnjena, nakon čega je homogenizirana do finog praha pomoću kugličnog mlina. Za dobivanje ujednačene veličine čestica, iste su prosijane kroz sito veličine pora 450 µm. Ovako pripremljena sirovina čuvana je u papirnoj vreći na tamnom i suhom mjestu pri sobnoj temperaturi te je korištena u provedbi eksperimenata kako je opisano u nastavku.

##### 3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) i/ili HPLC čistoće, osim ako nije drugačije naznačeno.

###### 3.1.2.1 Ekstrakcija hemiceluloze

###### *Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari*

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96%, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

###### *Depektinizacija razrijeđenom kiselinom*

- Klorovodična kiselina 1M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

###### *Delignifikacija*

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

- Natrijev klorit, Acros Organics (New Jersey, MA, SAD)
- Octena kiselina, J.T. Baker (Pennsylvania, SAD)

#### *Alkalna ekstrakcija*

- Aceton, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol 96 %, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Kalijev hidroksid, T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Natrijev bor-hidrid, Acros Organics (New Jersey, MA, SAD)
- Octena kiselina, J.T. Baker (Pennsylvania, SAD)

#### *3.1.2.2. Određivanje monomernog sastava polisaharidnih frakcija*

##### *Potpuna kiselinska hidroliza*

- Kalcijev karbonat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Standardi monosaharida: manoza, ramnoza monohidrat, riboza, glukuronska kiselina, galakturonska kiselina monohidrat, glukoza (bezvodna), ksiloza, galaktoza, arabinoza, fukoza, LLG International (Meckenheim, Njemačka)
- Sumporna kiselina 2,5 M, Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- Sumporna kiselina, konc., Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)

##### *Priprema 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) derivata*

- 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP reagens), Acros Organics (New Jersey, Ma, SAD)
- Kloroform, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina 1M, Kefo (Ljubljana, Slovenija)
- Metanol, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Natrijev hidroksid 1M, Kefo (Ljubljana, Slovenija)

##### *Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti*

- Acetonitril, J. T. Baker (Pennsylvania, SAD)
- Fosforna kiselina 85 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat, Acros Organics (New Jersey, MA, SAD)
- Natrijev hidroksid u zrncima, Gram-mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)

### 3.1.3. Oprema i uređaji

#### 3.1.3.1. Ekstrakcija hemiceluloze

##### *Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari*

- Aparatura za filtraciju (boca sisaljka, Büchnerov lijevak, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske Duran boce (1000 mL), staklene menzure od 500 mL, plastične menzure od 1000 mL, laboratorijske boce od 2000 mL
- Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)

##### *Depektinizacija razrijeđenom kiselinom*

- Aparatura za filtraciju (boca sisaljka, Büchnerov lijevak, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Laboratorijske boce (500 mL), Duran (Wertheim/Main, Njemačka)
- Laboratorijsko posuđe: odmjerne tikvice, laboratorijske čaše, špatule, magnetići
- pH-metar, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Tehnička vaga, AND GF 3000 EC (Massachusetts, SAD)
- Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)

##### *Delignifikacija*

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Aparatura za filtraciju (boca sisaljka, Büchnerov lijevak, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske čaše, laboratorijske boce (Duran, 1000 mL), Petrijeve zdjelice, špatule
- pH-metar, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)

##### *Alkalna ekstrakcija*

- Aparatura za filtraciju (boca sisaljka, Büchnerov lijevak, brtve, vodena vakuum sisaljka, filter papir Whatman No.1)
- Centrifuga, Thermo Scientific SL 8R (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijske boce (1000 mL), Duran (Wertheim/Main, Njemačka)



- Laboratorijsko posuđe: laboratorijske čaše od 100 mL, magnetići, Falcon epruvete od 15 mL i 50 mL, staklene menzure od 250 mL i 1000 mL
- Magnetska mješalica, IKA (Staufen, Njemačka)
- pH-metar, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvia)

#### *Dijaliza*

- Centrifuga ,Thermo Scientific SL 8R (Massachusetts, SAD)
- Laboratorijsko posuđe: Falcon epruvete od 50 mL, laboratorijske čaše od 50 i 100 mL
- Membrane za dijalizu, Cellu Sep, nominal MWCO 6000-8000 Da; 7,96 mL/cm (Membrane Filtration Products, Inc.; Taksas, SAD)
- Magnetska mješalica, Wisd SM HS-6 (Werthrim, Njemačka)
- Plastične čaše od 5000 mL, Vitlab (Großostheim, Njemačka)

#### *Liofilizacija*

- Laboratorijsko posuđe: Petrijeve zdjelice (staklene i plastične)
- Laboratorijski zamrzivač
- Liofilizator FreeZone 1, Labconco (Kansas City, MO, SAD)

#### *3.1.3.2. Određivanje monomernog sastava polisaharidnih frakcija*

##### *Potpuna kiselinska hidroliza polisaharidnih uzoraka*

- Analitička vaga, Mettler-Toledo (Zürich, Švicarska)
- Automatska pipeta 20-200 µL, 100-1000 µL, Gilson (Wisconsin, SAD)
- Laboratorijsko posuđe: staklene epruvete s pripadajućim PP čepovima s brtvom, stakleni štapići, Eppendorf epruvete od 2 mL, špatule
- pH indikatorske trakice 0-14, LLG Labware (Meckenheim, Germany)
- Stolna centrifuga za Eppendorf epruvete 1,5 i 2 mL
- Uljna kupelj s miješanjem HBR 4 control, IKA (Staufen, Njemačka)
- Vortex V-1 plus, Biosan (Riga, Latvia)

### *Priprema 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) derivata*

- Automatska pipeta 20-200 µL, 100-1000 µL, Gilson (Wisconsin, SAD)
- Laboratorijsko posuđe: Eppendorf epruvete od 2 mL, plutajući stalci za Eppendorf epruvete, staklene pipete od 2 mL, propipete, staklene čaše
- pH indikatorske trakice 0-14, LLG Labware (Meckenheim, Njemačka)
- Stolna centrifuga za Eppendorf kivete
- Vodena kupelj, Termomedicinski aparati „Bodalec“ TKS-1 (Dugo Selo, Hrvatska)
- Vortex-1 plus, Biosan (Riga, Latvia)

### *Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti*

- Mikrofilteri od regenerirane celuloze (RC), veličine pora 0,2 µm, promjera 15 mm, Phenomenex (SAD)
- HPLC viala s pripadajućim navojnim čepovima sa septom, Agilent Technologies (SAD)
- HPLC kolona-Zorbax Extend-C18 Analytical 4,6x250 mm 5-micron, Agilent Technologies (SAD)
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s PDA (engl. *Photo Diode Array*) detekcijom-Agilent 1200 Series, Agilent Technologies (SAD)

## **3.2. METODE RADA**

### 3.2.1. Izdvajanje etanolno-ekstraktibilnih tvari

#### Postupak rada:

U laboratorijskim bocama od 1000 mL pomiješa se suhi usitnjeni uzorak i 70 %-tni etanol u omjeru 1:10 w/v (u ovom slučaju masa uzorka iznosila je 70 g, odnosno volumen ekstrakcijskog otapala 700 mL; 70%-tni etanol (1 L) pripremljen je miješanjem 730 mL 96 %-tnog etanola i 270 mL demineralizirane vode). Sadržaj se miješa 30 minuta pri sobnoj temperaturi, nakon čega se filtrira preko aparature za filtraciju s vodenom vakuum sisaljkom. Zaostali talog na filter papiru kvantitativno se prenese u istu bocu te se ekstrakcija ponovi još 2 puta. Nakon zadnje (treće) ekstrakcije, ekstrahirani talog suši se izmjenom otapala. U tu svrhu, talog se ispiri s 2 puta po 350 mL 96 %-tnog etanola te zatim s 200 mL acetona. Kod svakog ispiranja potrebno je u potpunosti resuspendirati talog u odgovarajućem otapalu te

odvojiti čvrsti talog filtracijom prije sljedećeg ispiranja. S obzirom da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, cjelokupni postupak potrebno je izvoditi u digestoru. Nakon zadnjeg ispiranja, isprani talog prebaci se u odgovarajuću posudu, prekrije staničevinom te se ostavi u digestoru kako bi sav aceton ishlapio. Osušeni uzorak se prema potrebi dodatno homogenizira u tarioniku prije sljedećeg koraka u izdvajanju hemiceluloze.

#### Izračun rezultata:

Udjel etanolno-ekstraktibilne tvari određuje se mjerenjem suhe tvari etanolnog ekstrakta. U tu svrhu potrebno je zadržati kvantitativan način rada tijekom trostruke ekstrakcije 70 %-tnim etanolom, združiti sav dobiveni etanolni ekstrakt te istome precizno odrediti ukupni volumen. Za određivanje suhe tvari potrebno je izuzeti adekvatan alikvot homogenog ukupnog ekstrakta, a određivanje se provodi sušenjem do konstantne mase prema AOAC metodi 930.15 (AOAC, 1990). U ovom radu korišten je prethodno dobiven podatak (navedeno u poglavlju „Rezultati i rasprava“) za udjel etanolno-ekstraktibilne tvari prema gore opisanom postupku.

#### 3.2.2. Depektinizacija razrijeđenom kiselinom

Depektinizacija sirovine provedena je prema radu Sun i Hughes-ove (1998), uz modifikacije.

#### Postupak rada:

U Duran boce od 500 mL odvaže se 20 g prethodno pripremljene sirovine (osušeni uzorak nakon trostruke ekstrakcije 70 %-tnim etanolom) te se doda 500 mL (omjer kruto/tekuće=1:25, w/v)) otopine klorovodične kiseline, pH=1,5 (otopina se prethodno pripremi u dostatnom volumenu zakiseljavanjem destilirane vode klorovodičnom kiselinom (1 M), pri čemu se postizanje željene pH vrijednosti prati pH metrom). Pripremljena smjesa stavi se u vodenu kupelj zagrijanu na 90 °C te se ekstrakcija pektina provodi tijekom 2 h od postizanja željene temperature u boci (prati se termometrom, približno 10 min). Tijekom ekstrakcije potrebno je povremeno (svakih 10 min) ručno promiješati sadržaj boce kako bi se ekstrakcija provodila u homogenom volumenu. Po završetku ekstrakcije, boce se izvade iz kupelji te se ohlade u hladnoj vodenoj kupelji prije filtriranja depektinizirane sirovine preko Büchnerovog lijevka pomoću vakuuma. Depektinizirana sirovina (talog na filteru) ispire se destiliranom vodom u obrocima po 100 mL, kako bi se isprao sav ekstrahirani pektin te klorovodična kiselina. Ispiranje se provodi dok se ne postigne odgovarajuća pH vrijednost filtrata (pH= 4). Depektinizirani talog će se koristiti kao početna sirovina za ekstrakciju ksilana

te se u tu svrhu materijal suši izmjenom otapala, čime se uklanja višak vode iz uzorka. Talog se prvo ispiri 2 puta s 200 mL 96 %-tnog etanola, a zatim s 200 mL acetona. Prilikom ispiranja potrebno je potpuno resuspendirati talog u odgovarajućem otapalu te isprani talog odvojiti pomoću aparature za filtraciju prije sljedećeg ispiranja. Budući da se radi o lako hlapivim i zapaljivim otapalima, cjelokupni postupak potrebno je izvoditi u digestoru. Nakon zadnjeg ispiranja, isprani talog prebaci se u odgovarajuću posudu, prekrije staničevinom te ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi, odnosno dok se uzorak ne osuši. Osušeni uzorak se prema potrebi dodatno homogenizira u tarioniku ili mlinu za kavu prije sljedećeg ekstrakcijskog koraka.

### 3.2.3 Delignifikacija natrijevim kloritom i octenom kiselinom

Delignifikacija depektiniziranog uzorka provedena je prema predloženom protokolu Kumar-a i suradnika (2013), uz modifikacije.

#### Postupak rada:

U Duran boce od 1000 mL odvaže se 15 g prethodno pripremljenog depektiniziranog uzorka te se doda 480 mL demineralizirane vode (omjer kruto/tekuće=1:32, w/v) prethodno zagrijane na 70 °C, 9 g natrijevog klorita ( $\text{NaClO}_2$ ) (0,6g/g s.tv. uzorka) i 9 ml ledene octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (0,6 ml/g uzorka). Boca se začepi (čep se ne zavrne do kraja) te se stavi u vodenu kupelj termostatisiranu na 70 °C. Delignifikacija se provodi pri navedenoj temperaturi uz povremeno ručno miješanje laganim okretanjem boce, kako bi reakcijska smjesa bila homogena. Ukupno trajanje ekstrakcije bilo je varijabilni parametar, kao i dohranjivanje reakcijske smjese natrijevom kloritom i octenom kiselinom (Tablica 1).

**Tablica 1.** Varijabilni parametri delignifikacije ljuske oraha

<i>Oznaka uzorka</i>	<b>Ukupno trajanje delignifikacije (h)</b>	<b>Ukupan broj dohrana</b>	<b>Količina reaktanata u jednoj dohrani</b>	<b>Vrijeme dohrane</b>
<i>WS D2h</i>	2	2	0,6 g (mL)/g uzorka	0 min; 60 min
<i>WS D4h</i>	4	4	0,6 g (mL)/g uzorka	0 min; 60 min; 120 min; 180 min

Tijekom delignifikacije, reakcijom natrijevog klorita i octene kiseline, dolazi do stvaranja otrovnog plina, klorovog dioksida, žuto-zelene boje i nagrizaćućeg mirisa te je cjelokupni postupak delignifikacije potrebno izvoditi u digestoru i dobro ventiliranom prostoru, uz korištenje zaštitne odjeće, rukavica i naočala, a otpadne kemikalije potrebno je zbrinuti na adekvatan način. Nakon završene delignifikacije, smjesa se ohladi u hladnoj vodenoj kupelji te se filtrira preko Büchnerovog lijevka (filter papir Whatman No.1) pomoću vakuuma. Talog na filteru (holoceluloza) ispiri se demineraliziranom vodom u obrocima od 100 mL do neutralnog pH (pH matičnog filtrata je u kiselom području zbog dodane octene kiseline kao i kiselog medija reakcije). Isprani talog holoceluloze je blijedožućkaste do bijele boje zbog efekta izbjeljivanja. Dobiveni talog koristi se kao početni materijal za alkalnu ekstrakciju te se prije toga suši izmjenom otapala. U tu svrhu, dobro isprani talog ispiri se 2 puta s 200 mL 96 %-tnog etanola te s 200 mL acetona. Prilikom svakog ispiranja potrebno je dobro resuspendirati talog u odgovarajućem otapalu te isti odvojiti filtracijom pomoću vakuuma. Nakon ispiranja acetonom, talog se kvantitativno prenese u odgovarajuću posudu, prekrije staničevinom i ostavi u digestoru kako bi sav aceton ishlapio. Osušena holoceluloza se prema potrebi dodatno usitni prije sljedećeg ekstrakcijskog koraka.

#### Izračun rezultata:

Gubitak mase delignifikacijom izračunava se gravimetrijski iz razlike mase suhog uzorka prije i nakon delignifikacije (1), zbog čega je neophodno provoditi kvantitativan način rada tijekom cijelog postupka.

$$\text{gubitak m delignif. (\%)} = (m_1 - m_2)/m_{\text{ekv1}} * 100 \quad (1)$$

Pri čemu je:

$m_1$  - masa suhog uzorka prije delignifikacije

$m_2$  - masa suhog uzorka nakon delignifikacije

$m_{\text{ekv1}}$  - ekvivalentna masa uzorka prije delignifikacije mase originalnog uzorka (g)

Da bi se izračunao gubitak mase delignifikacijom u odnosu na originalni uzorak, koristi se ekvivalentna masa originalnog uzorka ( $m_{\text{ekv1}}$ ) koja predstavlja masu uzorka prije delignifikacije uvećanu za gubitak mase etanolnom ekstrakcijom i depektinizacijom, tj. ekstrakcijskim koracima koji prethode delignifikaciji. Ekvivalentna masa izračunava se prema izrazu (2).

$$m_{\text{ekv1}} = m_1 / (1 - (\% \text{ekstraktibilnih tvari} + \% \text{pektina}) / 100)) \quad (2)$$

Pri čemu je:

$m_1$  - masa uzorka prije delignifikacije (g)

Delignifikacija ljuske oraha provedena je u duplikatu, a rezultati su izraženi kao udjel (%) izgubljene mase originalnog uzorka.

### 3.2.4. Alkalna ekstrakcija hemiceluloze iz holoceluloze

#### Postupak rada:

Alkalna ekstrakcija hemiceluloze provedena je na holocelulozi dobivenoj delignifikacijom prethodno ekstrahiranog i depektiniziranog uzorka, ali također i na nedelignificiranom uzorku, tj. uzorku koji je prethodno samo ekstrahiran etanolom i depektiniziran. U laboratorijske čaše od 100 mL odvaže se 2 g depektinizirane sirovine ili 1 g holoceluloze te se doda pripremljena otopina kalijevog hidroksida (2 M i 4 M KOH) s dodatkom 20 mM natrijevog borhidrida ( $\text{NaBH}_4$ ) u omjeru 1:20 w/v, odnosno 40 mL otopine na 2 g ekstrahiranog depektiniziranog uzorka i/ili 20 mL otopine na 1 g holoceluloze. Natrijev borhidrid ( $\text{NaBH}_4$ ) u reakciji djeluje kao reducens, koji sprječava degradativno djelovanje lužine, odnosno tzv. *peeling* efekt kojim se degradira polimerni lanac s reducirajućeg kraja. Dodatak  $\text{NaBH}_4$  rezultira redukcijom aldonske skupine reducirajućeg kraja u hidroksidnu, čime je daljnje napredovanje reakcije onemogućeno (Sjostrom, 1993). Ekstrakcija ksilana provodi se pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje na magnetskoj mješalici. Trajanje ekstrakcije bilo je varijabilno te je iznosilo 2 h ili 4 h za obje vrste uzoraka. Nakon završene ekstrakcije, sadržaj čašica kvantitativno se prebaci u Falcon epruvete od 50 mL te se supernatant, u kojem se nalazi otopljeni hemiceluloza, odvoji od celuloznog ostatka centrifugiranjem (8000 o/min, 10 minuta, 25 °C). Matični supernatant izdvoji se u zasebnu laboratorijsku čašu, dok se talog ispire dvostrukim volumenom demineralizirane vode u odnosu na volumen matičnog supernatanta (20 mL ili 40 mL). Supernatant od ispiranja spoji se s matičnim supernatantom te se združeni alkalni ekstrakt podvrgne neutralizaciji do pH 6. U tu svrhu, polagano se dodaje koncentrirana octena kiselina u hlađeni združeni ekstrakt (hlađenje u hladnoj vodenoj kupelji ili smjesi vode i leda) uz konstantno miješanje i praćenje promjene pH vrijednosti otopine pH-metrom. Neutralizacija se provodi polagano jer dolazi do pjenjenja uslijed degradacije  $\text{NaBH}_4$  i razvoja plinovitih produkata, pri čemu točno mjerenje pH i praćenje neutralizacije može biti otežano. Također, budući da su plinoviti produkti

zapaljivi i toksični, neutralizaciju alkalnog ekstrakta nužno je izvoditi u digestoru. Neutralizirani ekstrakt kvantitativno se prenese u odgovarajuću menzuru te se istom izmjeri volumen. Precipitacija hemiceluloznih polisaharida iz ekstrakta provodi se u laboratorijskoj boci odgovarajućeg volumena dodavanjem četverostrukog volumena 96 %-tnog etanola u odnosu na volumen ekstrakta. Etanol se dodaje polagano i uz istovremenu homogenizaciju smjese. Smjesa se drži na +4 °C preko noći kako bi se induciralo potpuno taloženje hemiceluloze pri zadanim uvjetima. Nakon završene precipitacije, talog hemiceluloze kvantitativno se izdvaja filtracijom na Büchnerovom lijevku (Whatman No.1) pomoću vakuuma. Kvantitativno prenošenje taloga iz boce provodi se pomoću etanolne otopine istog sastava koji je postignut i kod precipitacije (voda:etanol= 1:4 v/v), a izdvojeni talog se na kraju ispiri s 2 puta po 15 mL etanola i dobro se ocijedi pomoću vakuuma. Talog hemiceluloze zatim se kvantitativno prenosi s filtera u laboratorijsku čašicu i resuspendira se (otopi) u približno 10 mL demineralizirane vode na magnetskoj mješalici, čime se uzorak priprema za dijalizu. Celulozni ostatak nakon alkalne ekstrakcije i inicijalnog ispiranja dodatno se ispiri demineraliziranom vodom, do postizanja pH vrijednosti supernatanta 7 (ispiranje viška lužine) i potom se suši izmjenom otapala. U tu svrhu se talog u Falcon epruveti ispiri 2 puta s 20 mL etanola i jednom s 20 mL acetona. Prilikom svakog ispiranja potrebno je dobro resuspendirati talog u odgovarajućem otapalu pomoću vorteksa, a između ispiranja talog se odvaja centrifugiranjem. Nakon ispiranja acetonom, celulozni talog u Falcon epruveti pokrije se staničevinom i ostavi u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. S obzirom da se sušenje provodi lako hlapivim i zapaljivim otapalima, postupak je nužno izvoditi u digestoru.

### 3.2.5. Dijaliza i sušenje izdvojenih polisaharidnih frakcija

Dijaliza je membranski proces u kojem otopljene čestice male molekulske mase difundiraju kroz polupropusnu membranu iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije do postizanja ravnoteže. Osim toga, membrane mogu biti različite veličine pora pa se otopljene molekule mogu razdvajati i po principu ekskluzije, odnosno zadržavanja molekula većih od veličine pora s jedne strane membrane i prolazak manjih molekula zbog razlike u koncentraciji.

### Postupak rada:

Dijaliza resuspendiranih hemiceluloznih precipitata provodi se kako bi se uklonili ostaci eventualno koprecipitirane soli kalijevog acetata (nastale tijekom neutralizacije alkalnog ekstrakta), ali i drugih koprecipitiranih spojeva male molekulske mase, kao i zaostalog etanola. Pročišćavanje uzoraka dijalizom nužno je kako bi se precizno gravimetrijski mogli odrediti prinosi hemiceluloza.

Duljina tubularne dijalizacijske membrane određuje se s obzirom na dimenzije iste (7,96 mL/cm) te ukupni volumen otopine koja će se dijalizirati. Također, potrebno je uračunati i prostor za zatvaranje membrane s donje i gornje strane, kao i prostor za dodatni ulazak vode u membranu tijekom dijalize. Membrane se nakon rezanja na odgovarajuće dimenzije peru i razdvajaju s unutrašnje strane vrućom vodom, a zatim i demineraliziranom vodom te se s jedne strane zatvaraju čvrstim čvorom. Prethodno pripremljeni uzorci resuspendiranih precipitata hemiceluloze kvantitativno se prenose s minimalnom količinom demineralizirane vode (nekoliko mL) u pripremljene dijalizacijske membrane, koje se zatvore na drugom kraju odgovarajućim zatvaračima. Membrane s uzorkom se u potpunosti uranjaju u plastične laboratorijske čaše od 5 L ispunjene demineraliziranom vodom, kojoj je prethodno izmjerena vodljivost pomoću konduktometra. Uspješnost dijalize također se prati konduktometrijski, dok se ne postigne početna izmjerena vodljivost, što označava završenu dijalizu. Kako bi se dijaliza provodila odgovarajućom brzinom, izvanmembransku tekućinu potrebno je izmjenjivati u određenim vremenskim intervalima (svakih nekoliko sati), u svrhu održavanja koncentracijskog gradijenta otopljenih tvari kao pogonske sile dijalize. U ovom slučaju, dijaliza je trajala 24 h uz izmjenu izvanmembranske tekućine 2 puta (ukupni utrošak demineralizirane vode bio je 15 L).

Precipitirana hemiceluloza nije se mogla u potpunosti otopiti, što je postalo još vidljivije tijekom dijalize, kada se na dnu dijalizacijske membrane izdvojila netopljiva hemicelulozna frakcija. Nakon završene dijalize, ukupni sadržaj membrana se kvantitativno prenosi u Falcon epruvete te se dvije dobivene frakcije, topljiva i netopljiva, odvajaju centrifugiranjem (8000 o/min, 10 minuta, 25 °C). Talog se nakon centrifugiranja ispire malom količinom demineralizirane vode, a združeni supernatant kvantitativno se prenosi u Petrijeve zdjelice, koje se pokrivaju izbušenim poklopcima te smrzavaju na -80 °C. Smrznuti uzorci sušeni su liofilizacijom tijekom najmanje 36 h. Ovako dobiveni uzorak predstavlja topljivu hemiceluloznu frakciju.



Talog netopljive hemiceluloze u Falcon epruvetama suši se izmjenom otapala ispiranjem 2 puta s 10 mL etanola i jednom s 10 mL acetona (dobro resuspendirati i odvojiti otapalo centrifugiranjem između ispiranja). Nakon ispiranja acetonom, epruvete se prekriju staničevinom i ostave u digestoru dok sav aceton ne ishlapi. Osušena netopljiva frakcija hemiceluloze dodatno je usitnjena u kugličnom mlinu.

Nakon provedenog postupka optimizacije ekstrakcijskih uvjeta za izdvajanje hemiceluloze iz ljuske oraha, dobivene su polisaharidne frakcije kako je prikazano u Tablici 2.

**Tablica 2.** Izdvojene polisaharidne frakcije iz ljuske oraha

<i>Oznaka eksperimenta</i>	Delignifikacija	Alkalna ekstrakcija		Oznaka polisaharidne frakcije
		koncentracija KOH	trajanje ekstrakcije	
WS D- 2M 2h	-	2 M	2 h	T.H., N.H., C
WS D- 2M 4h	-	2 M	4 h	T.H., N.H., C
WS D- 4M 2h	-	4 M	2 h	T.H., N.H., C
WS D- 4M 4h	-	4 M	4 h	T.H., N.H., C
WS D2h 2M 2h	+ (2 h)	2 M	2 h	T.H., N.H., C
WS D2h 2M 4h	+ (2 h)	2 M	4 h	T.H., N.H., C
WS D2h 4M 2h	+ (2 h)	4 M	2 h	T.H., N.H., C
WS D2h 4M 4h	+ (2 h)	4 M	4 h	T.H., N.H., C
WS D4h 2M 2h	+ (4 h)	2 M	2 h	T.H., N.H., C
WS D4h 2M 4h	+ (4 h)	2M	4 h	T.H., N.H., C
WS D4h 4M 2h	+ (4 h)	4 M	2 h	T.H., N.H., C
WS D4h 4M 4h	+ (4 h)	4 M	4 h	T.H., N.H., C

### Izračun rezultata:

Prinosi svih polisaharidnih frakcija dobiveni su preciznim mjerenjem masa osušenih uzoraka, zbog čega je potrebno raditi kvantitativno tijekom cijelog postupka ekstrakcije zajedno s dijalizom i sušenjem.

Prinosi hemiceluloznih frakcija (topljive i netopljive frakcije), kao i celulozne frakcije, izračunati su s obzirom na masu suhih polisaharidnih frakcija te početnu masu uzorka prema izrazima (3) i (4).

$$\text{prinos frakcije (\%)} = m_3/m_{\text{ekv2}}*100 \quad (3)$$

$$m_{\text{ekv2}} = m_4/(1 - (\% \text{ekstraktibilnih tvari} + \% \text{pektina} + \% \text{gubitka m delignif.})/100)*100 \quad (4)$$

Pri čemu je:

$m_3$  - masa suhe polisaharidne frakcije (g)

$m_4$  - masa holoceluloze (g)

Ekstrakcija hemiceluloze provedena je u duplikatu, a rezultati prinosa pojedinih frakcija izraženi su kao % suhe tvari originalnog uzorka. Prinosi topljivih i netopljivih hemiceluloznih frakcija prikazani su i kao relativni prinosi u odnosu na ukupno ekstrahiranu hemicelulozu.

### 3.2.6. Potpuna kiselinska hidroliza polisaharidnih uzoraka

Potpuna kiselinska hidroliza prilagođena je prema internom protokolu Francuskog nacionalnog insituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Centar Angers-Nantes) koji je pripremljen prema radu Englysta i Cummingsa (1988).

### Postupak rada:

#### *A) Hidroliza netopljivih polisaharida (s predhidrolizom)*

U staklene epruvete pažljivo se odvaži  $10 \pm 1$  mg (pročišćenih frakcija, tj. svi delignificirani uzorci), odnosno  $25 \pm 2$  mg (netopljivi kompleksni uzorci, tj. nedelignificirani celulozni ostaci i alkoholno netopjivi ostatak) polisaharidnog uzorka pazeći da uzorak ne ostaje po stijenkama epruvete. Zatim se pažljivo dodaje 250  $\mu\text{L}$  72 %-tne v/v (13 M) sumporne kiseline (također pazeći da kiselina ne ostaje po stijenci epruvete) te se uzorak inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 30 min uz polagano miješanje staklenim štapićem, kojim se osigurava potpuni kontakt uzorka i jake kiseline. Svrha ovog postupka, koji se još naziva i predhidrolizom, je narušavanje visoko uređene strukture netopljivih polisaharida te

njihova solvatacija. Nakon završene predhidrolize, kiselina se razrjeđuje dodatkom 2,25 mL demineralizirane vode te 0,5 mL pripremljenog internog standarda riboze, koncentracije 2,4 mg/mL. Uzorci se vorteksiraju (tek onda se izvade stakleni štapići), začepi i stave u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C. Hidroliza pri povišenoj temperaturi, nakon predhidrolize, provodi se tijekom 2 h.

#### *B) Hidroliza topljivih polisaharida (bez predhidrolize)*

Kao i kod netopljivih uzoraka, topljivi polisaharidi pažljivo se odvažu u staklene epruvete ( $10 \pm 1$  mg), doda se 1,3 mL demineralizirane vode te se uzorci otope laganim protresanjem epruvete (paziti da miješanje nije prejako, kako se uzorak ne bi zalijepio za stijenke epruvete). Zatim se dodaje 1,2 mL 2,5 M sumporne kiseline i 0,5 mL otopine internog standarda riboze, koncentracije 2,4 mg/mL. Uzorci se lagano promiješaju protresanjem epruveta ili rotacijom na najmanjoj brzini na vorteksu i stave se u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C, gdje se provodi hidroliza tijekom 2 h. Iznimku čine uzorci topljivog polisaharida pektina za kojeg je hidrolizu potrebno provoditi 6 h, kako bi došlo do potpune hidrolize ramnogalakturonana te 2 h zbog očuvanja prinosa arabinana.

I u slučaju topljivih i netopljivih polisaharida, početni uvjeti prije hidrolize na visokoj temperaturi trebali bi biti jednaki, odnosno, jednaka koncentracija kiseline u reakcijskoj smjesi (1 M) te jednaka koncentracija internog standarda (400 µg/mL).

Zajedno s uzrocima hidrolizira se i smjesa standarada, kako bi se uračunali eventualni gubici monosaharida utjecajem visoke temperature i kiselog medija. Uzorak standarada za hidrolizu priprema se u staklenoj epruveti pipetiranjem 0,5 mL otopine standarada koncentracije približno 1 mg/mL za svaki standard; zatim se dodaje 0,4 mL 2,5 M sumporne kiseline i 0,1 mL demineralizirane vode. Pripremljeni uzorak homogenizira se laganom rotacijom na vorteksu i stavi se u uljnu kupelj zagrijanu na 100 °C, tijekom cijelog predviđenog trajanja hidrolize.

#### *C) Neutralizacija kiselih hidrolizata*

Nakon završene hidrolize, uzorci u epruvetama ohlade se u hladnoj vodenoj kupelji (ili smjesi vode i leda), homogeniziraju se vorteksiranjem te centrifugiraju, kako bi se istaložile neotopljene komponente. Za neutralizaciju se uzima 1 mL bistrog supernatanta u Eppendorf epruvete (2 mL), a ostatak kiselog hidrolizat može se čuvati na -20 °C. Neutralizacija se provodi dodatkom praškastog kalcijevog karbonata, čija količina se izračuna iz stehiometrije reakcije neutralizacije (za alikvot 1 mL i koncentraciju kiseline približno 1 M, količina

CaCO<sub>3</sub> iznosi 0,11 g, odnosno dodaje se približno 0,13 g CaCO<sub>3</sub>). Dodavanjem CaCO<sub>3</sub> dolazi do stvaranja teško topive soli kalcijevog sulfata (CaSO<sub>4</sub>), zbog kojeg smjesa poprima bijelu boju, te oslobađanja plinovitog ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>), zbog čega se uzorak pjeni, stoga je CaCO<sub>3</sub> potrebno dodavati postupno. Nakon što se doda predviđena količina CaCO<sub>3</sub>, uzorak se centrifugira, a supernatantu se mjeri pH, koji po završetku neutralizacije iznosi 6-7 (provjerava se pH indikatorskim trakicama). Ostatak neutralnog hidrolizata izdvaja se i čuva na -20 °C za potrebe daljnjih analiza. Hidroliza svih uzoraka provedena je u duplikatu.

### 3.2.7. Priprema 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (PMP) derivata

Derivatizacija monosaharida dobivenih potpunom kiselinskom hidrolizom, kao i standarada, provedena je prema postupku Sun-a i suradnika (2014), uz manje modifikacije.

#### Postupak rada:

U Eppendorf epruvetu od 2 mL automatskom pipetom pipetira se 50 µL neutralnog hidrolizata te 50 µL 0,6 M otopine natrijevog hidroksida (NaOH) te se smjesa izmiješa na vorteksu; zatim se dodaje 100 µL PMP reagensa (0,5 M otopina u metanolu), smjesa se ponovo homogenizira na vorteksu, a epruvete se dobro začepi. Reakcijska smjesa se inkubira 60 minuta u vodenoj kupelji zagrijanoj na 70±2 °C, uz homogeniziranje vorteksom (nakon 20. i 40. minute reakcije). Nakon završene derivatizacije, reakcijska smjesa se hladi u hladnoj vodenoj kupelji približno 5 min te se neutralizira dodatkom 100 µL 0,3 M otopine klorovodične kiseline (HCl) uz homogenizaciju vorteksom. Smjesa se nadopuni do 1 mL demineraliziranom vodom (doda se 700 µL H<sub>2</sub>O) i homogenizira te se istoj izmjeri pH, koji treba biti u blago kiselom do neutralnom području (pH 4-6). Suvišak PMP derivatizacijskog reagensa uklanja se uzastopnim ekstrakcijama s kloroformom, koji se dodaje u omjeru 1:1 (v:v). Svaka od ukupno tri ekstrakcije kloroformom provodi se tijekom 30 sekundi, uz intenzivno miješanje na vorteksu, nakon čega se odjeljivanje faza pospješuje kratkim centrifugiranjem pomoću stolne mini centrifuge. Izdvojena gornja vodena faza, u kojoj se nalaze PMP-derivati monosaharida, koristi se za HPLC analizu, dok se organska faza (kloroform) baca.

### 3.2.8. Analiza PMP derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC analiza PMP derivata provedena je prema metodi razvijenoj u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda PBF-a.

#### Postupak rada:

Derivatizirani uzorci se prije HPLC analize profiltriraju kroz mikrofiltere od regenerirane celuloze veličine pora 0,2 µm u odgovarajuće viala. Analiza je provedena gradijentnom eluacijom na C18 koloni (Zorbax Extend 4,6 x 250 mm, 5 µm) kombinacijom dviju komponenata mobilne faze - otapala A, kojeg čini 100 mM natrij-fosfatni pufer pH 8,0, i otapala B, kojeg čini acetonitril (AcN). Eluacija je provedena prema sljedećem gradijentu: 0 min - 12% B; 35 min 17% B; 36 min - 20% B; 45 min - 20% B; 46 min - 12% B; 65 min - 12% B uz protok 1 mL/min i temperaturu kolone 25 °C. Detekcija PMP derivata monosaharida omogućena je primjenom PDA detektora, snimanjem signala na 245 nm. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću programa ChemStation (Agilent Technologies). Redoslijed eluacije PMP-derivata određen je usporedbom retencijskih vremena pikova u uzorku s pikovima na kromatogramu smjese standarada.

#### Izračun rezultata:

Kvantifikacija identificiranih pikova omogućena je primjenom internog standarda (riboze). Prvo se obradom kromatograma standarada (standardi poznate koncentracije, među kojima se nalazi i interni standard, a koji su podvrgnuti hidrolizi zajedno s uzorcima) izračunaju faktori odziva (RF, engl. *Response Factors*)) svakog monosaharida u odnosu na interni standard, prema izrazu (5).

$$RF = (A_{IS} \cdot c_x) / (A_x \cdot c_{IS}) \quad (5)$$

Pri čemu je:

$A_{IS}$  - površina pika internog standarda

$c_{IS}$  - koncentracija internog standarda

$A_x$  - površina pika analita (standarda)

$c_x$  - koncentracija analita (standarda)

Jednom kad se uspostave faktori odziva, ista formula primjenjuje se i za obradu kromatograma uzoraka, pri čemu su poznate površine pikova internog standarda i analita

(očitaju se iz izvješća kromatograma), koncentracija (masa) internog standarda te faktor odziva za analit, a traži se koncentracija (masa) analita.

Dobivene mase pojedinog monosaharida množe se s faktorima polimerizacije (0,9 za heksoze; 0,88 za pentoze; 0,907 za uronske kiseline i 0,89 za deoksi šećere), a udjeli homopolimernih oblika (%) pojedinih monomera u uzorku izračunavaju se s obzirom na odvagu uzorka prije hidrolize.

Rezultati monosaharidnog sastava polisaharidnih uzoraka prikazani su kao srednje vrijednosti udjela (%) u odgovarajućoj frakciji.

Također, izračunate su bilance (% iskorištenja) najzastupljenijih monosaharida usporedbnom inicijalnog udjela odgovarajućeg monosaharida te udjela istog u izdvojenim polisaharidnim frakcijama (topljiva i netopljiva hemiceluloza te celulozni ostatak) i prinosima odgovarajućih frakcija.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

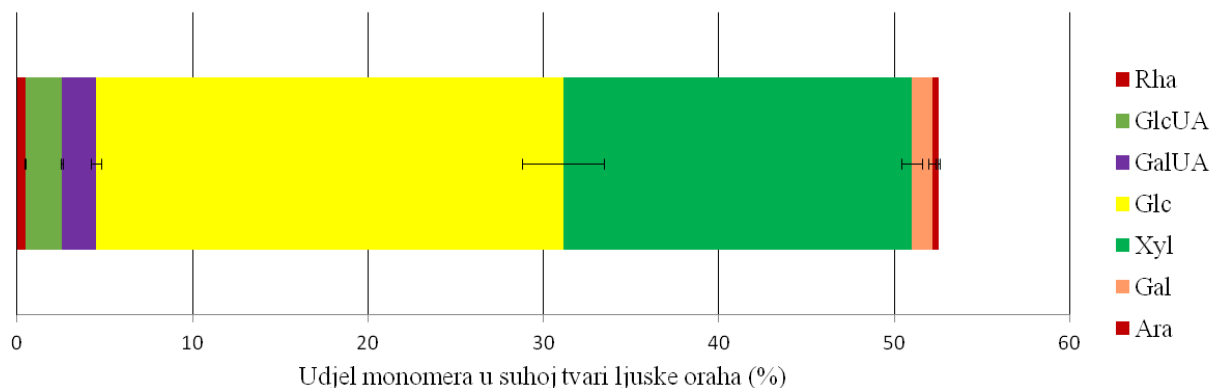
S obzirom na količinu i mogućnosti iskorištavanja, agro-industrijski otpad se u današnje vrijeme smatra vrijednom sekundarnom biljnom sirovinom za izdvajanje različitih komponenti. Sekundarne biljne sirovine nastaju nakon industrijskih procesa obrade primarnih sirovina te se izdvajaju kao nusproizvod i obnovljive su prirode. Zbog zanimljivog kemijskog sastava, agro-industrijski otpad danas predstavlja potencijalno vrijednu sekundarnu sirovinu za izdvajanje različitih spojeva u svrhu njihovog ponovnog korištenja u prehrambenoj industriji (Mateos-Aparicio i sur., 2010). Povećano zanimanje za polisaharide staničnih stijenki u novije vrijeme proizlazi iz njihovog potencijala za konverziju u različite biotehnološke proizvode. U prehrambenoj industriji, primjena hemiceluloza ima razvijenu upotrebu u različitim tehnologijama, a u današnje vrijeme sve više do izražaja dolaze i funkcionalni aspekti ugljikohidratnih frakcija. Sekundarna biljna sirovina bogat je izvor nutrijenata, što je poželjno za razvoj funkcionalne hrane. U skladu s rastućim interesom različitih industrija za polisaharidnim frakcijama sekundarnog biljnog materijala, u ovom radu izvršena je ekstrakcija i karakterizacija ksilana iz ljuske oraha u svrhu ispitivanja potencijala hemicelulozne frakcije navedene sirovine za daljnje iskorištavanje (npr. za proizvodnju ksilooligosaharida, koji imaju potencijalno prebiotički učinak). Osim toga, cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj promjene ekstrakcijskih parametara na prinos i monomerni sastav ksilana iz otpadne biomase ljuske oraha.

Prinosi ksilana s obzirom na promjenjive ekstrakcijske uvjete određeni su gravimetrijski, dok je detaljan sastav istih određen primjenom HPLC-PDA metode s prethodnom PMP derivatizacijom, koja je u tu svrhu razvijena u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### **4.1. ANALIZA MONOMERNOG SASTAVA POLISAHARIDNIH FRAKCIJA LJUSKE ORAHA**

Monomerni sastav izdvojenih polisaharidnih frakcija sirovine određen je nakon potpune kiselinske hidrolize, analizom dobivenih hidrolizata. Hidrolizati su podvrgnuti derivatizaciji PMP reagensom, nakon čega je uslijedila HPLC-PDA analiza. Određivanjem monomernog sastava olakšava se identifikacija i karakterizacija polisaharidnih frakcija ljuske oraha.

Monomerni sastav suhe tvari originalne sekundarne sirovine ljuske oraha prikazan je na Slici 4.



**Slika 4.** Monomerni sastav suhe tvari originalne sekundarne sirovine ljuske oraha (Rha-ramnoza, GlcUA-glukuronska kiselina, GalUA-galakturonska kiselina, Glc-glukoza, Xyl-ksiloza, Gal-galaktoza, Ara-arabinoza).

Analiza monomernog sastava suhe tvari ljuske oraha provedena je na alkoholno netopljivom ostatku (te preračunata na suhu tvar originalnog uzorka), kako nativno prisutni jednostavni šećeri ne bi interferirali prilikom interpretacije rezultata, odnosno kako ne bi došlo do prividnog povećanja udjela pojedinih monomera, koji su sastavni dio polisaharidnog matriksa stanične stijenke ljuske oraha. Navedenim postupkom identificirano je 5 neutralnih šećera (ramnoza, glukoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza) te dvije uronske kiseline (glukuronska i galakturonska kiselina). U radu Vojvodić i suradnika (2016) navodi se da je u ljusci oraha teško detektirati prisutnost manoze, ramnoze i arabinoze, što ovisi o udjelu koji je najčešće vrlo mali, ali i o metodi detekcije. U monomernom sastavu ljuske oraha u ovom radu detektirane su ramnoza i arabinoza, ali u vrlo malom udjelu, dok manaza nije detektirana. U najvećem udjelu detektirane su glukoza i ksiloza, što je u suglasju s rezultatima istraživanja Vojvodić i suradnika (2016).

Iz dobivenih rezultata (Slika 4) vidljivo je da gotovo 53 % suhe tvari sirovine čine strukturni polisaharidi u čijem sastavu dominiraju ksiloza i glukoza, odnosno ukupni glukani i ukupni ksilani. Udjel ukupnog glukana u ljusci oraha iznosi 26,6 % što je 50 % polisaharidne suhe tvari, dok je ksilana 19,9 % što čini 38 % suhe tvari sirovine. Prisutnost glukoze vezuje se uz celuloznu frakciju, budući da je celuloza linearni homopolimer izgrađen od glukoze. S obzirom na prisutnost galakturonske kiseline, ramnoze, arabinoze, galaktoze i glukoze, može se zaključiti da je u sirovini prisutna i pektinska frakcija. Hemiceluloznu frakciju ljuske oraha



karakterizira relativni udjel ksiloze od 50 %, što ukazuje na prisutnost hemiceluloze ksilanskoga tipa. S obzirom na značajnu prisutnost ksilana ili ksilanskog tipa hemicelulozne frakcije u staničnoj stijenci ljuske oraha (Vojvodić i sur., 2016), u čijem sastavu prevladava ksiloza, ljuska oraha kategorizirana je kao ksilanom bogata sirovina koja može poslužiti za ekstrakciju ksilana i biokonverzije u različite produkte.

#### 4.2. ANALIZA GUBITKA SUHE TVARI TIJEKOM POJEDINIH POSTUPAKA EKSTRAKCIJE KSILANA IZ LJUSKE ORAHA

Izdvajanje hemicelulozne frakcije iz ljuske oraha započelo je ekstrakcijom u 70 %-tnom etanolu, kako bi se uklonile hidrofilne komponente male molekulske mase, osobito nestrukturani ugljikohidrati kao što su šećerni alkoholi, glukoza, fruktoza, saharoza i škrob (Raessler i sur., 2010). Kako bi se olakšalo izdvajanje hemicelulozne frakcije, provedeni su postupci depektinizacije i delignifikacije (2 h i 4 h). Tijekom navedenih ekstrakcijskih koraka došlo je do značajnog gubitka suhe tvari te su rezultati prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3.** Gubitak suhe tvari ljuske oraha, izražen kao % originalnog uzorka, tijekom pojedinih koraka izdvajanja hemiceluloze (do alkalne ekstrakcije )

	Gubitak suhe tvari (%)		
	nedelignificiran	delignificiran	delignificiran
	uzorak	uzorak	uzorak
		2 h	4 h
<i>Ekstrakcija 70%-tnim etanolom</i>	2,53	2,53	2,53
<i>Izdvajanje pektinskih tvari</i>	0,88	0,88	0,88
<i>Delignifikacija</i>	-	18,99	26,26
<i>Ukupni gubitak suhe tvari prije alkalne ekstrakcije</i>	3,41	22,40	29,67

U koraku ekstrakcije 70 %-tnim etanolom izdvojen je mali udjel suhe tvari od 2,53 %, on je nužan, jer bi u suprotnome slobodni šećeri mogli interferirati u daljnjim analizama i davati netočne kvalitativne i kvantitativne podatke, odnosno, uklanjanje ekstraktibilne suhe tvari važno je za uspostavljanje preciznih bilanci.

Izdvajanje pektinskih tvari izvršeno je ekstrakcijom s razrijeđenom klorovodičnom kiselinom pri povišenoj temperaturi. Gubitak suhe tvari tijekom izdvajanja pektinskih tvari iznosi 0,88 %. Mali udjel pektina karakterističan je za ljusku oraha, budući da udjel pektina u stanicama drvenastih tkiva iznosi do 5 % (Northcote, 1972; Jarvis i sur., 1988; Ridley i sur., 2001). Udjel ukupnog pektina može se procijeniti iz udjela galakturonske kiseline u uzorku, koja je glavni konstituent navedenoga heteropolisaharida, ali i iz udjela ramnoze, arabinoze i galaktoze, koje se nalaze u njegovom sastavu (Jalc i sur., 1998).

S obzirom na osnovne konstituente pektina i monosaharide detektirane u originalnoj sirovini ljuske oraha (Slika 4), procijenjeno je da ga ova sekundarna biljna sirovina sadrži oko 3 %. Albersheim i suradnici (1960) došli su do zaključka da, ovisno o smještaju pektina u staničnoj stijenci, pektin može biti topljiv i netopljiv (tzv. „rezidualni pektin“). Dakle, većina pektina izdvojena je depektinizacijom, ali dio udjela ukupnog pektina pripada i rezidualnom pektinu. Hemicelulozna frakcija je kompleksna frakcija u staničnoj stijenci različitih biljaka, koja tvori takve interakcije s celulozom, ligninom i ostalim komponentama, koje otežavaju izdvajanje hemicelulozne frakcije iz stanične stijenke (Bian i sur., 2012; Moine i sur., 2007). Iz tog razloga, a u svrhu povećanja ekstraktibilnosti hemicelulozne frakcije biljnih sirovina, provodi se postupak uklanjanja lignina iz stanične strukture, odnosno delignifikacija (Jacobs i Dahlman, 2001). Iz Tablice 3 vidljivo je da je delignifikacija koja je trajala duže (4 h) uzrokovala veći gubitak suhe tvari u odnosu na delignifikaciju koja je trajala 2 h (26,26 % u odnosu na 18,99 %). S obzirom na dužu vremensku izloženost djelovanju povišene temperature (70 °C) i octene kiseline (CH<sub>3</sub>COOH), za očekivati je da će se pri tim ekstrakcijskim uvjetima ukloniti i više lignina iz sirovine.

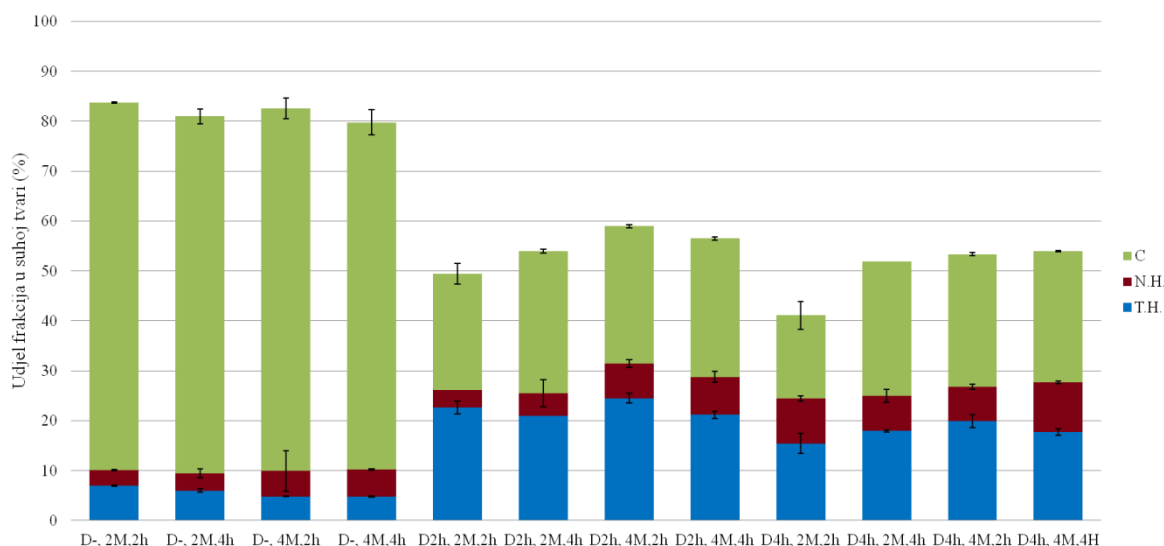
Izdvajanjem lignina dobivena je holoceluloza, tj. polisaharidna frakcija sastavljena od ukupne hemiceluloze i celuloze, s kojom je nastavljena ekstrakcija ksilana iz ljuske oraha u koraku alkalne ekstrakcije. Osim delignificiranih uzoraka, u daljnjim koracima parcijalne hidrolize polisaharidnih frakcija tretiran je i nedelignificiran, depektinizirani uzorak ljuske oraha. Tijekom alkalne ekstrakcije, varirana je koncentracija lužine i trajanje ekstrakcije. Primjenjenim postupkom ekstrakcije izdvojene su tri polisaharidne frakcije-topljiva hemiceluloza, netopljiva hemiceluloza te celulozna frakcija, za svaki promjenjivi parametar

postupka izdvajanja, te je određen udjel pojedinih polisaharidnih frakcija u originalnom uzorku sekundarne sirovine ljske oraha (Slika 5)

#### 4.3. ANALIZA PRINOSA KSILANSKIH FRAKCIJA LJUSKE ORAHA

Prinos hemiceluloznih frakcija (topljive i netopljive frakcije), kao i celulozne frakcije izračunat je s obzirom na masu suhih polisaharidnih frakcija te početnu masu uzorka.

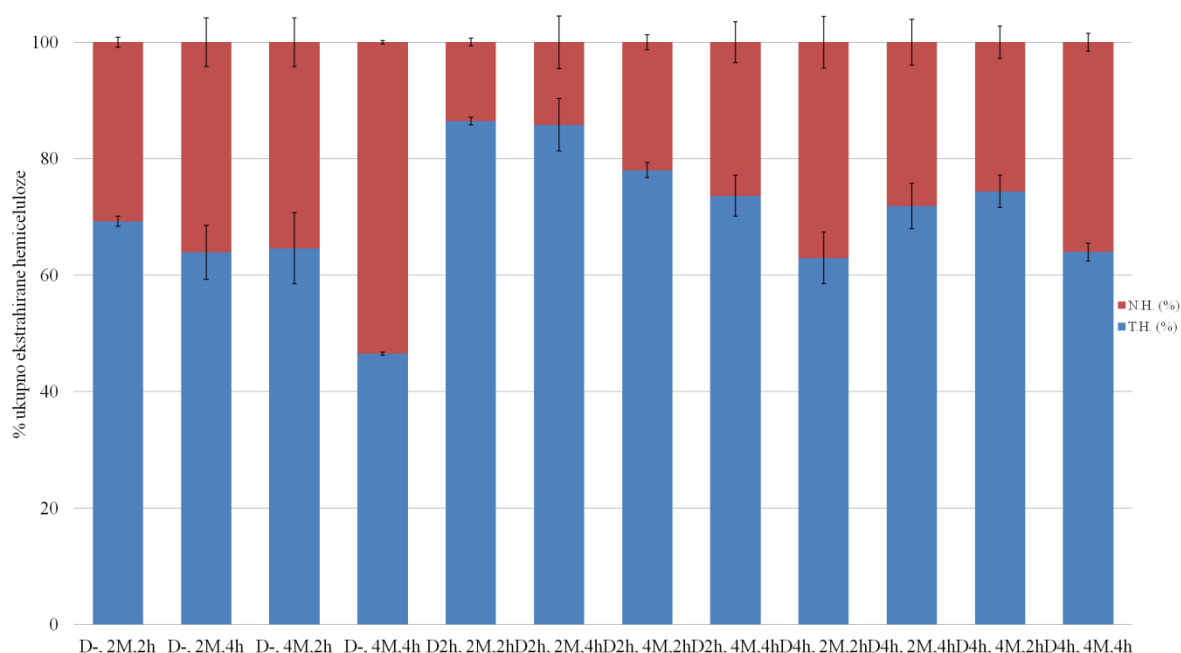
Ekstrakcija hemiceluloze provedena je u duplikatu, a rezultati prinosa pojedinih frakcija izraženi su kao % suhe tvari originalnog uzorka. Prinosi topljive i netopljive hemicelulozne te celulozne frakcije prikazani su, kao i relativni prinosi, u odnosu na ukupno ekstrahiranu hemicelulozu.



**Slika 5.** Udjel pojedinih polisaharidnih frakcija u originalom uzorku sekundarne sirovine ljske oraha  
(T.H.-topljiva hemicelulozna frakcija, N.H.-netopljiva hemicelulozna frakcija, C-celulozna frakcija)

Prema rezultatima na Slici 5, vidljivo je da je udjel celulozne frakcije veći kod nedelignificiranih, u odnosu na delignificirane uzorke te iznosi oko 70 %. Osim toga, udjel celulozne frakcije je kod ovih uzoraka veći u odnosu na topljivu i netopljivu hemiceluloznu frakciju. Celuloznu frakciju nedelignificiranih uzoraka ljske oraha, uz celulozu, čini i ostatak neekstrahirane hemiceluloze te lignin, zbog čega je prinos iste prividno veći. Kod delignificiranih uzoraka, udjel celulozne frakcije je gotovo dvostruko niži u odnosu na nedelignificirane uzorke, budući da se procesom delignifikacije prekidaju interakcije između

lignina, celuloze i hemiceluloze. Nakon procesa delignifikacije, topljiva i netopljiva hemicelulozna frakcija postaju dostupnijima i pogodnijima za ekstrakciju. Kako navode Lavarack i suradnici (2002), korištenjem kiseline i povišene temperature omekšava se zaštitni sloj lignina oko hemicelulozne frakcije te „dopušta“ kiselini ekstrakciju hemiceluloze. Među delignificiranim uzorcima nema velike razlike u prinosima topljive i netopljive hemicelulozne, kao ni celulozne frakcije. Dobiveni rezultati sugeriraju da djelovanjem lužine veće koncentracije ne dolazi do značajnijeg izdvajanja hemicelulozne frakcije. Osim udjela pojedinih polisaharidnih frakcija u originalnom uzorku sekundarne sirovine ljuske oraha, izračunati su i relativni prinosi topljive i netopljive hemicelulozne frakcije ljuske oraha (izraženi kao % ukupno ekstrahirane hemiceluloze), prikazani na Slici 6.

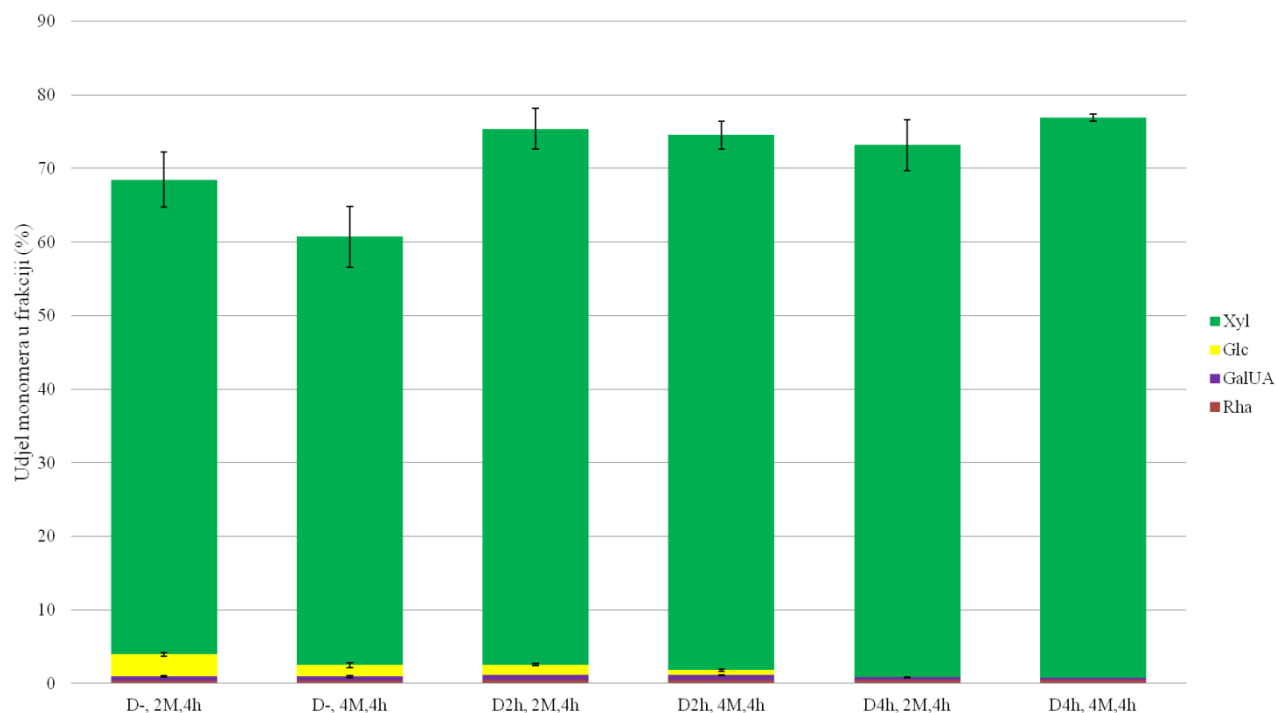


**Slika 6.** Relativni prinos topljive i netopljive hemicelulozne frakcije ljuske oraha  
(T.H.-topljiva hemicelulozna frakcija, N.H.-netopljiva hemicelulozna frakcija)

Rezultati prikazani na Slici 6 ukazuju na promjene u udjelima topljive i netopljive hemicelulozne frakcije u ukupno izdvojenoj hemicelulozi iz ljuske oraha, u odnosu na promjenjive uvjete ekstrakcije. Prinos topljive hemicelulozne frakcije kod nedelignificiranih uzoraka manji je u odnosu na delignificirane uzorke, što bi mogla biti posljedica kovalentne povezanosti hemiceluloze s ligninom (Lan i sur., 2011). Rezultati sugeriraju da povećanje koncentracije lužine kao ekstrakcijskog otapala utječe na povećanje relativnog prinosa topljive hemicelulozne frakcije. Vrijeme trajanja ekstrakcije nije imalo velikog utjecaja na

relativne prinose pojedinih hemiceluloznih frakcija, kao što je slučaj s udjelima pojedinih polisaharidnih frakcija u originalnom uzorku (Slika 5).

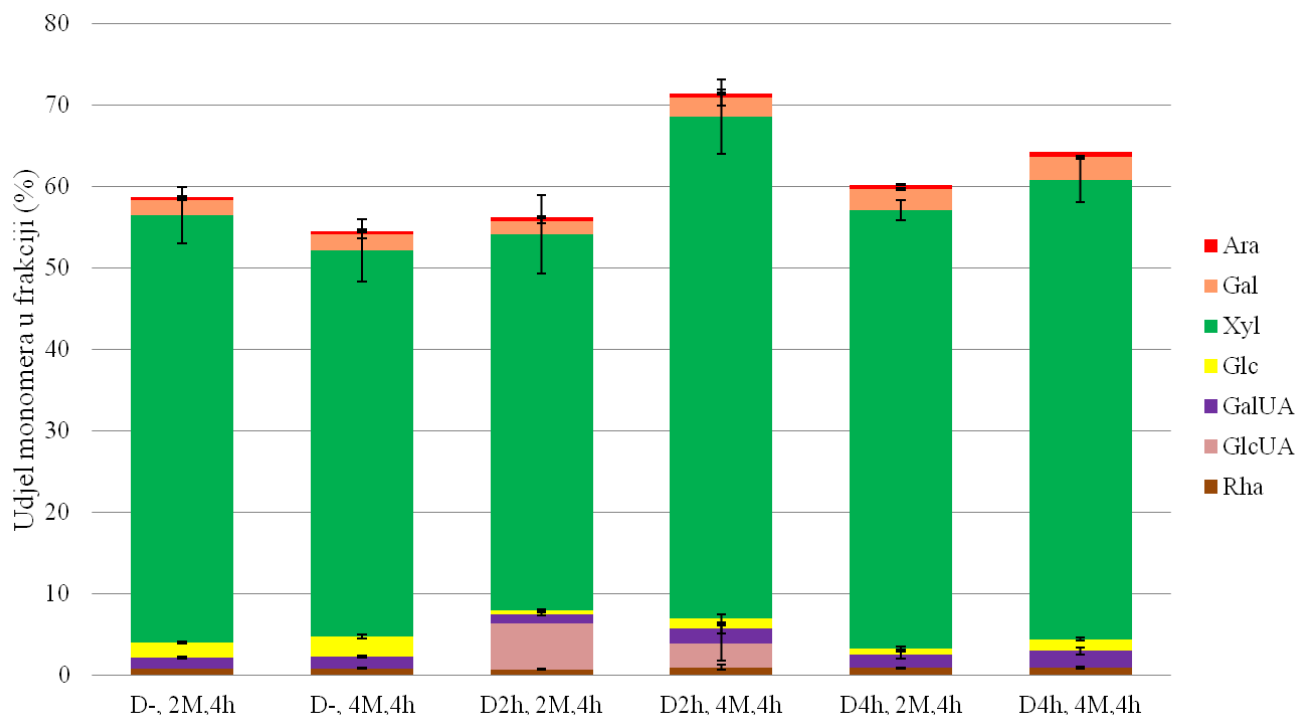
Monomerni sastav izdvojenih polisaharidnih frakcija svih sirovina određen je nakon potpune kiselinske hidrolize, analizom dobivenih hidrolizata. Hidrolizati su podvrgnuti derivatizaciji PMP reagensom, nakon čega je uslijedila HPLC-PDA analiza. Karakteristični monomerni profili izdvojenih polisaharidnih frakcija prikazani su na Slikama 7-9.



**Slika 7.** Monomerni sastav netopljive hemicelulozne frakcije ljske oraha  
(Xyl-ksiloza, Glc-glukoza, GalUA-galakturonska kiselina, Rha-ramnoza)

Sa Slike 7 vidljivo je da u monomernom sastavu netopljive hemicelulozne frakcije dominira ksiloza. Budući da je hemiceluloza biljnih sirovina sastavljena od ksiloze, ramnoze, arabinoze, manoze, glukoze i galaktoze te glukuronske kiseline (Jung i sur., 2015), glukoza je detektirana i u hemiceluloznoj frakciji ljske oraha, no u značajno manjem udjelu nego ksiloza. Pristutnost glukoze posljedica je prisutnosti glukana, koji se nalazi u staničnoj stijenci lignoceluloznih sirovina (Smith i Harris, 1999). Od ostalih monomera, u netopljivoj hemiceluloznoj frakciji ljske oraha su, također očekivano, prisutne galakturonska kiselina i ramnoza, koje su detektirane u vrlo malom udjelu. Prema rezultatima na Slici 7, relativni udjel ksiloze u netopljivoj hemiceluloznoj frakciji ljske oraha varira od 95 % do 98 %.

Delignifikacija te trajanje alkalne ekstrakcije nisu imali značajan utjecaj na sastav izdvojene netopljive frakcije ljuske oraha.

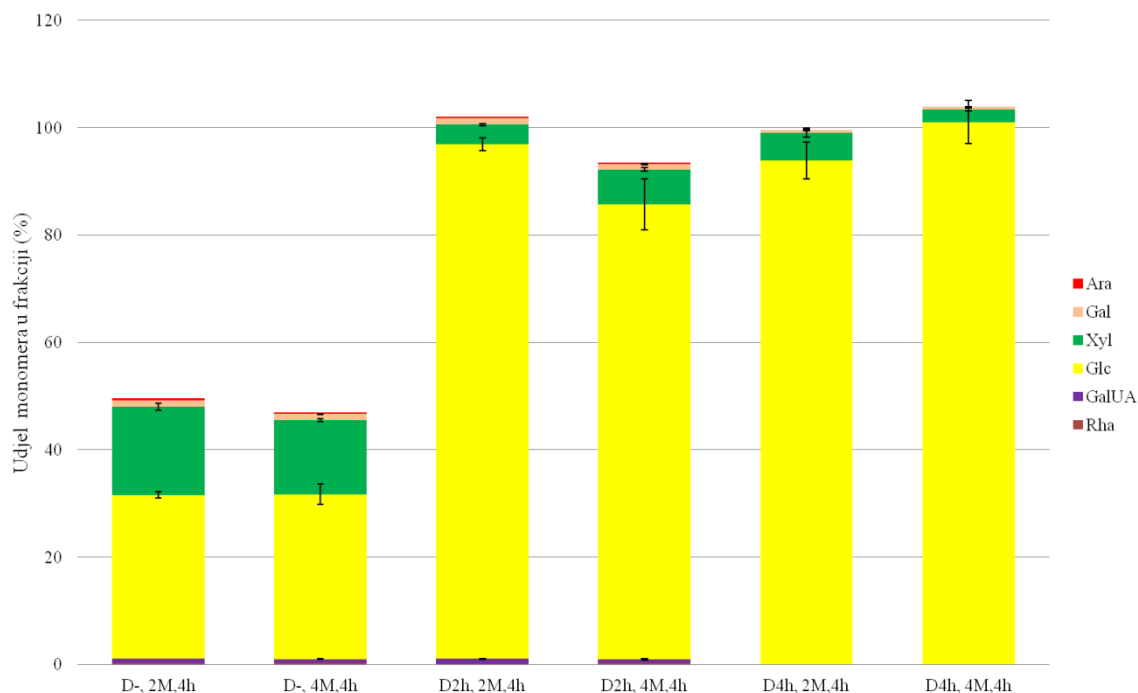


**Slika 8.** Monomerni sastav topljive hemicelulozne frakcije ljuske oraha

(Rha-ramnoza, GlcUA-glukuronska kiselina, GalUA-galakturonska kiselina, Glc-glukoza, Xyl-ksiloza, Gal-galaktoza, Ara-arabinoza)

Hemiceluloza je djelomično topljiva i higroskopna zbog otvorene strukture koju čine acetilne i hidroksilne skupine (Mohanty i sur., 2000). Iz rezultata na Slici 8 vidljivo je da ksiloza čini većinu monomernog sastava topljive hemicelulozne frakcije ljuske oraha, što ukazuje na prisutnost hemiceluloze ksilanskoga tipa. Relativni udjeli ukupnog ksilana (u odnosu na ukupno određene monomere) se u svim uzorcima kreću između 87 % i 89 %. Nadalje, nisu zamijećene velike promjene u udjelima ksiloze topljive hemicelulozne frakcije između delignificiranih i nedelignificiranih uzoraka, kao ni između uzoraka kod kojih je lignin izdvajan 2 h ili 4 h. Osim ksiloze, u uzorcima su detektirani i galakturonska kiselina, ramnoza, galaktoza i arabinoza, osnovni konstituenti pektinskih polisaharida (McCready i Gee, 1960), koje ukazuju na prisutnost rezidualnog pektina, tj. pektina koji nije ekstraktibilan u razrijeđenim otopinama jakih kiselina, ali i drugih polisaharida, poput glukuronoksilana. Upravo se prisutnošću rezidualnog pektina te drugih topljivih hemiceluloznih polisaharida, tj.

bliskim interakcijama između njih, može objasniti topljivi karakter ksilana izdvojenog u ovoj frakciji.



**Slika 9.** Monomerni sastav celulozne frakcije ljuske oraha

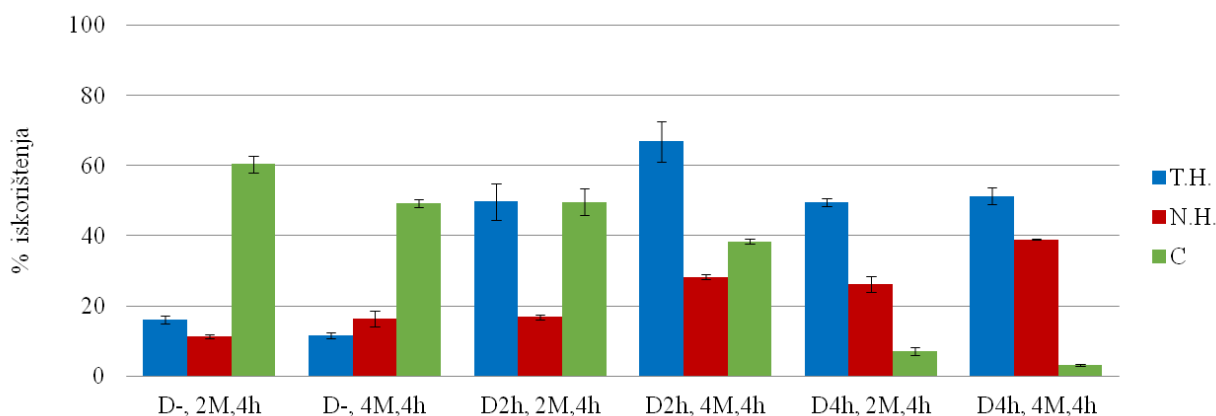
(Rha-ramnoza, GalUA-galakturonska kiselina, Glc-glukoza, Xyl-ksiloza, Gal-galaktoza, Ara-arabinoza)

Budući da je celuloza homopolimer glukoze, u monomernom sastavu celulozne frakcije ljuske oraha glukoza je u delignificiranim i nedelignificiranim uzorcima detektirana u najvećem udjelu. Uklanjanjem lignina iz sirovine doprinjelo je izdvajanju veće količine glukoze (Slika 9). Relativni udjeli glukoze u nedelignificiranim uzorcima su 61 % (ekstrakcija 2 M KOH, 4h), odnosno 65 % (ekstrakcija 4 M KOH, 4 h). Udjel glukoze u delignificiranim uzorcima (90-97 %) veći je u odnosu na njezin udjel u nedelignificiranim uzorcima, jer je lignin u sekundarnoj staničnoj stijenci vezan na celulozna vlakna. Najveći relativni udjel glukoze (97 %) određen je u uzorku delignificiranom 4 h, kod kojeg je alkalna ekstrakcija provedena s 4 M KOH. U odnosu na glukozu, u celuloznoj frakciji ljuske oraha udjeli ostalih monomera (galaktoza, arabinoza, galakturonska kiselina te ramnoza) značajno su manji. U ovim frakcijama detektirana je i ksiloza, odnosno rezidualni ksilan, čiji je relativni udjel mnogo manji nego u topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj frakciji te iznosi do 4 % u delignificiranim uzorcima i oko 30 % u nedelignificiranim uzorcima. Prisutnost rezidualnog ksilana predstavlja ksilan ili ksiloglukan u snažnoj interakciji s celulozom. Promjena

koncentracije KOH tijekom alkalne ekstrakcije nema zamjetan učinak na monomerni sastav celuloznih frakcija ljuske oraha.

#### 4.4. BILANCE POLISAHARIDNIH FRAKCIJA

Bilance pojedinih monomera izračunate su s obzirom na udjele istih u izdvojenim ksilanskim frakcijama. Balance su prikazane kao % ukupnog iskorištenja u odnosu na inicijalni udjel promatranog monosaharida u ljusci oraha, odnosno kao relativno iskorištenje pojedinog monomera unutar pojedine frakcije u odnosu na ukupno iskorištenje. Balance su uspostavljene za ksilozu (Slika 10) i glukozu (Slika 12), dok je relativno iskorištenje izračunato za ksilozu (Slika 11), kao dominantnu ksilansku komponentu, a s obzirom na visoki udjel iste u originalnoj sirovini i najvažnijeg pokazatelja uspješnosti ispitivanih ekstrakcijskih uvjeta.

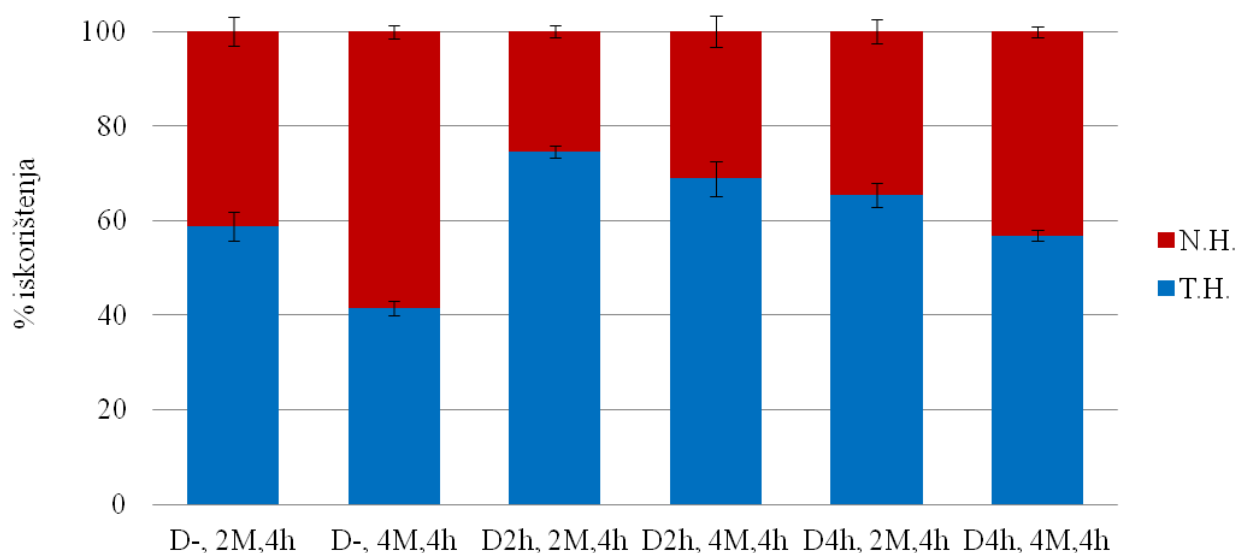


**Slika 10.** Bilanca ksiloze za primijenjene postupke izdvajanja ksilana iz ljuske oraha, izražena kao % iskorištenja inicijalno prisutne ksiloze u sirovini (T.H.- topljiva hemicelulozna frakcija, N.H.-netopljiva hemicelulozna frakcija, C-celulozna frakcija)

Prema rezultatima na Slici 9, vidljivo je da iskorištenja ukupne ksiloze u nedelignificiranim uzorcima topljive i netopljive frakcije iznose oko 30 %, dok iskorištenje ksiloze u celuloznoj frakciji iznosi oko 50 %. Vidljiv je utjecaj delignifikacije na ekstrakciju ksilana, budući da je u nedelignificiranim uzorcima oko 55 % ukupno iskorištenog ksilana zaostalo u celuloznoj frakciji. Prethodnom delignifikacijom, tj. uklanjanjem lignina iz ljuske oraha, omogućuje se učinkovitije djelovanje lužine te se povećava ekstraktibilnost ksilana. U



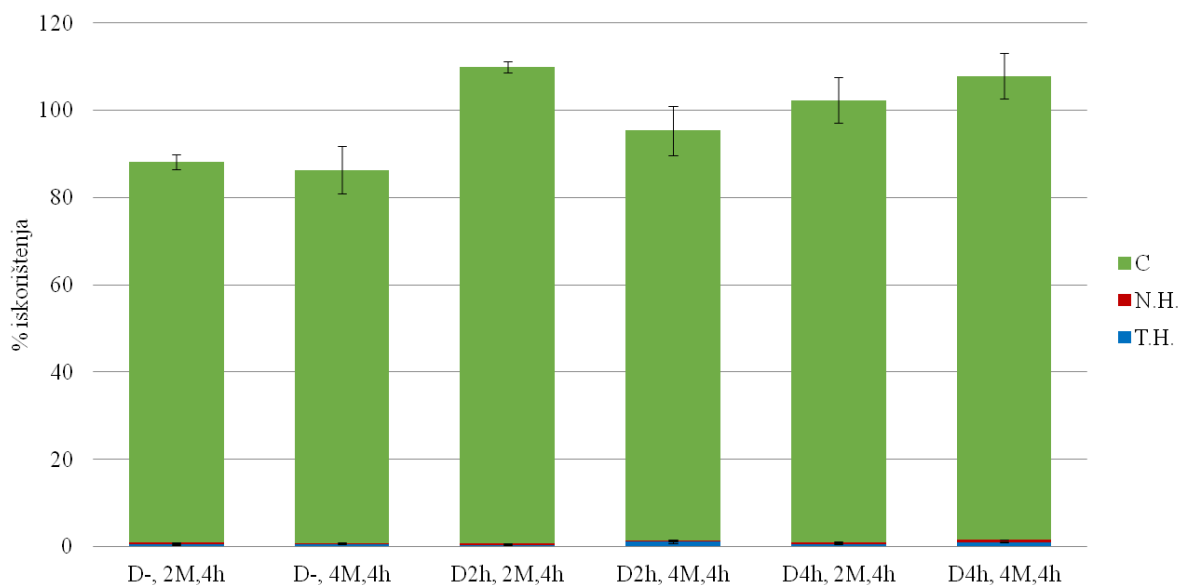
delignificiranim uzorcima, iskorištenje ksiloze veće je iz hemicelulozne, nego iz celulozne frakcije. Duže vrijeme delignifikacije, kao i veća koncentracija KOH prilikom alkalne ekstrakcije pogodovali su većem ukupnom iskorištenju ksilana, te je najbolji rezultat postignut delignifikacijom u trajanju od 4 h i alkalne ekstrakcije s 4 M KOH u trajanju 4 h što je rezultiralo zaostajanjem najmanje količine ksilana u celuloznoj frakciji. Kod delignificiranih uzoraka, izdvojeni ksilan u ekstrahiranoj hemicelulozi nalazio se uglavnom u topljivoj frakciji. Prema rezultatima na Slici 9, oko 10 % ksiloze koja se nalazi u celuloznoj frakciji delignificiranih uzoraka nije moguće izdvojiti. Prinosi ksiloze iznad 100 % ukazuju na analitičku pogrešku.



**Slika 11.** Relativno iskorištenje ukupne ksiloze iz ljuske oraha

(T.H.-topljiva hemicelulozna frakcija, N.H.-netopljiva hemicelulozna frakcija)

Rezultati na Slici 11 sugeriraju da je relativno iskorištenje ukupne ksiloze iz ljuske oraha veće iz topljive, nego iz netopljive hemicelulozne frakcije, što odgovara postotku iskorištenja inicijalno prisutne ukupne ksiloze u sirovini (Slika 10). Relativno iskorištenje ksiloze u uzorcima kreće se između 60 % i 70 %. Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da povećanje koncentracije lužine kao ekstrakcijskog otapala te produljenje trajanja same ekstrakcije doprinosi povećanju relativnog iskorištenja netopljive hemicelulozne frakcije.



**Slika 12.** Bilanca glukoze za primijenjeni postupak izdvajanja glukana iz ljuske oraha, izražena kao postotak iskorištenja inicijalno prisutne ukupne glukoze u sirovini (T.H.-topljiva hemicelulozna frakcija, N.H.-netopljiva hemicelulozna frakcija, C-celulozna frakcija)

Iz rezultata na Slici 12 vidljivo je da je iskorištenje glukoze najveće iz celulozne frakcije ljuske oraha, dok je iskorištenje glukoze iz hemicelulozne frakcije gotovo zanemarivo. Ovakvi rezultati su očekivani, budući da je glukoza osnovni konstituent celulozne frakcije (Sharma, 2015). Dobiveni rezultati u suglasju su s rezultatima sa Slike 9, gdje su udjeli glukoze u celuloznoj frakciji iznad 95 %. Delignifikacija, koncentracija KOH kao ekstrakcijskog otapala, kao ni samo vrijeme trajanja alkalne ekstrakcije, nisu imali velikog utjecaja na iskorištenje glukoze. Udjel glukana u topljivoj i netopljivoj hemiceluloznoj frakciji iznosi oko 3 %. Iskorištenja inicijalno prisutne ukupne glukoze u sirovini iznad 100 % upućuju na analitičku pogrešku.

Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da koncentracija KOH kao ekstrakcijskog otapala te samo trajanje alkalne ekstrakcije nemaju značajnog utjecaja na bilancu ksiloze (Slika 10) te na raspodjelu ksiloze unutar topljive i netopljive frakcije (Slika 11).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primijenjenim postupcima izdvajanja ksilana iz ljuske oraha izdvojene su tri frakcije: topljiva i netopljiva hemicelulozna te celulozna frakcija.
2. Potpunom kiselinskom hidrolizom te primjenom HPLC analize s prethodnom PMP derivatizacijom monomernog sastava izdvojenih frakcija detektirano je pet neutralnih monosaharida: ramnoza, glukoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza te dvije uronske kiseline: glukuronska i galakturonska kiselina.
3. Dominatne monomerne komponente izdvojenih frakcija ljuske oraha bile su glukoza i ksiloza.
4. Udjel ukupnog glukana u ljusci oraha iznosi 26,6 %, što čini 50 % polisaharidne suhe tvari, dok je udjel ksilana 19,9 %, što čini 38 % suhe tvari sirovine. Navedene komponente predstavljaju glavinu iskoristivog ugljikohidratnog dijela ljuske oraha.
5. U sastavu ukupno izdvojene hemiceluloze iz ljuske oraha udjelom dominira topljivi oblik hemicelulozne frakcije.
6. Primjenom lužine veće koncentracije kao ekstrakcijskog otapala ostvaruju se veći relativni prinosi topljive hemicelulozne frakcije, dok vrijeme trajanja ekstrakcije nema značajan utjecaj na izdvajanje iste.
7. Relativni udjel ksiloze u izdvojenim polisaharidnim frakcijama varira između 95 % i 98 % (od toga je najviše, oko 90 %, prisutno u topljivoj hemiceluloznoj frakciji).
8. U nedelignificiranim uzorcima, iskorištenje ukupne ksiloze iz hemiceluloznih frakcija iznosi oko 30 %, dok iskorištenje ksiloze iz celulozne frakcije iznosi oko 50 %. Delignifikacija rezultira povećanjem iskorištenja ksiloze iz hemicelulozne frakcije.
9. Relativno iskorištenje ukupne ksiloze iz ljuske oraha veće je iz topljive, nego iz netopljive hemicelulozne frakcije te iznosi 60-70 %.

## 6. LITERATURA

Aachary, A. A., Prapulla, S. G. (2009) Value addition to corncob: Production and characterization of xylo-oligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Bioresource Technol.* **100**, 991–995.

Ai, Z., Jiang, Z., Li, L., Deng, W., Kusakabe, I., Li, H. (2005) Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. *Process Biochem.* **40**, 2707–2714.

Acikalin, K., Karaca, F. (2017) Fixed-bed pyrolysis of walnut shell: Parameter effects on yields and characterization of products. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **125**, 234–242.

Alba, K., Kontogiorgos, V. (2016) Pectin at the oil-water interface: Relationship of molecular composition and structure to functionality. *Food Hydrocolloid.* **68**, 211–218.

Albersheim, P., Muhkethaker, K., Frey-Wyssling, A. (1960) Stained Pectin as Seen in the Electron Microscope. *J. Biophys. Biochem. Cy.* **8**, 501–506.

Akpinar, O., Erdogan, K., Bostanci, S. (2009a) Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food Bioprod. Process.*, **87**, 145–151.

Akpinar, O., Erdogan, K., Bostanci, S. (2009b) Production of xylo-oligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydr. Res.* **344**, 660–666.

Akpinar, O., Erdogan, K., Bakir, U., Yilmaz, L. (2010). Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk for preparation of xylo-oligosaccharides. *Food Sci. Tech.* **43**, 119–125.

Anonymous 1 (2011) Infinitiv...više od okusa  
<[http://www.infinitiv.hr/home/index.php?option=com\\_content&view=article&id=192&Itemid=211](http://www.infinitiv.hr/home/index.php?option=com_content&view=article&id=192&Itemid=211)> . Pristupljeno 14. srpnja 2017.

AOAC (1990) Moisture in animal feed -AOAC method 930.15. *Official methods of analysis of AOAC international*, 15. izdanje, AOAC International, Arlington, Virginia.

Azevedo Carvalho, A. F., de Oliva Neto, P., Fernandes da Silva, D., Pastore, G. M. (2013) Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res. Int.* **51**, 75–85.

Balakrishnan, H., Dutta-Choudhary, M. D., Srinivasan, M. C., Rele, M. V. (1992) Cellulase-free xylanase production from an alkalophilic *Bacillus* species. *World J. Microb. Biot.* **8**, 627–631.

Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Convers. Manage.* **52**, 858–875.

Biely, P. (1985) Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**, 286–290.

- Brienzo, M., Carvalho, W., Milagres, A. M. F. (2010) Xylo-oligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse Using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. *Appl. Biochem. Biotech.* **162**, 1195–1205.
- Brienzo, M., Siqueira, A. F., Milagres, A. M. F. (2009) Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochem. Eng. J.*, **46**, 199–204.
- Cano, A., Palet, C. (2007) Xylooligosaccharides recovery from agricultural biomass waste treatment with enzymatic polymeric membranes and characteriaztion of products with MALDI-TOF-MS. *J. Membr. Sci.* **291**, 96.
- Carle, R., Keller, P., Schieber, A., Rentschler, C., Katzschnner, T., Rauch, D., Fox, G. F., Endress, H. U. (2001). Method for obtaining useful materials from the by-products of fruit and vegetable processing. Patent application WO 01/78859 A1.
- Choque Delgado, G. T., Tamashiro, W. M. S. C., Junior, M. R. M., Moreno, Y. M. F., Pastore, G. M. (2011) The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. *Food Res. Int.*, **40**, 3167–3173.
- Chung, Y. C., Hsu, C. K., Ko, C. Y., Chan, Y. C. (2007) Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. *Nutr. Res.* **27**, 756–761.
- Cravo, J. C. M., Sartori, D. L., Fiorelli, J. (2017) Agro-industrial waste composites as components for rural buildings. U: Lignocellulosic fibre and biomass-based composite materials; Processing, properties and application (Jawaid i sur., ured.), Elsevier Applied Science, London/New York, str. 13-25.
- da Silva, A. C., Jorge, N. (2014) Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. *Food Res. Int.* **66**, 493-500.
- Duan, X., Zhang, C., Srinivasakannan, C., Wang, X. (2017) Waste walnut shell valorization to iron loaded biochar and its application to arsenic removal. *Resource-Efficient Technologies* **3**, 29-36.
- Dorta, C., Cruz, R., Oliva-Neto, P., Moura, D. J. C. (2006) Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **33**, 1003-1009.
- Englyst, H.N., Cummings, J.H. (1988) Improved method of measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J. Assoc. off Ana. Chem.* **71**, 808-814.
- Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., Ayoub, A. (2017) Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Ind. Crop. Prod.* **107**, 370-377.
- Fernández-Agullóa, A., Pereirab, E., Freirea, M.S., Valentãoc, P., Andradec, P.B., González-Álvarez, J., Pereirab, J.A. (2013) Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind. Crops Prod.* **42**, 126–132.

- Galanakis, C. M. (2012) Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Tech.* **26**, 68-87.
- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J. C. (1999) Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylo-oligosaccharide production from wood. *J. Chem. Technol. Biot.* **74**, 1101-1109.
- Gomes, E., Guez, M. A. U., Martin, N., Silva, R. (2007) Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova* **30**, 136-145.
- Grootaert, C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W., Wiele, T. V. (2007) Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends Food Sci. Tech.* **18**, 64-71.
- Guan, Y., Zhang, B. Z., Qi, X. M., Peng, F., Yao, C. L., Sun, R. C. (2015) Fractionation of bamboo hemicelluloses by graded saturated ammonium sulphate. *Carbohydr. Polym.* **129**, 201-207.
- Gullón, P., Moura, P., Esteves, M., Girio, F. M., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2008) Assessment on the fermentability of xylo-oligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 7482-7487.
- Hall, M. B. (2007) Methodological challenges in carbohydrate analyses. *R. Bras. Zootec.* **36**, 359-367.
- Harvey, D.J. (2011) Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J Chromatogr. B.* **879**, 1196-1225.
- Hu, Y., Wang, T., Yang, X., Zhao, Y. (2014) Analysis of compositional monosaccharides in fungus polysaccharides by capillary zone electrophoresis. *Carbohydr. Polym.* **102**, 481-488.
- Hughes, S. A., Shewry, P. R., Li, L., Gibson, G. R., Sanz, M. L., Rastall, R. A. (2007) In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 4589-4595.
- Immerzeel, P., Falck, P., Adlercreutz, P., Karlsson, E. N., Stalbrand, H. (2014) Extraction of water soluble xylan from wheat bran and utilization of enzymatically produced xylooligosaccharides by *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Weissella* spp. *LWT-Food Sci. Technol.* **56**, 321-327.
- Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**, 25-38.
- Jacobs, A., Palm, M., Zacchi, G., Dahlam, O. (2003) Isolation and characterization of water-soluble hemicelluloses from flax shive. *Carbohydr. Res.* **338**, 1869.
- Jain, I., Kumar, V., Satyanarayana, T. (2015) Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. *Indian. J. Exp. Biol.* **53**, 131-142.

Jalili, T., Medeiros, D.M., Wildman, R.E.C. (2007) Dietary fiber and coronary heart disease. U: Handbook of nutraceuticals and functional food (Wildman, R.E.C., ured.), 2. izd., Taylor and Francis group, LLC, Boca Raton, str. 131-142.

Jiang, Z., Zhu, Y., Li, L., Kusakabe, X. Kitaoka, I. (2004) transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl D-xylobiosides and xylosides. *J. Biotechnol.* **114**, 125-134.

Jung, S. J., Kim, S. H., Chung, I. K. (2015) Comparison of lignin, cellulose, and hemicellulose contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. *Biomass Bioenerg.* **83**, 322-327.

Kulkarni, A. D., Joshi, A. A., Patil, C. L., Amale, P. D., Patel, H. M., Surana, S. J., Belgamwar, V. S., Chaudhari, K. S., Pardeshi, C. V. (2017) Xyloglucan: A functional biomacromolecule for drug delivery applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 799-812.

Kumar, R., Hu, F., Hubbel, C.A., Ragauskas, A.J., Wyman, C.E. (2013) Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity and impact on physicochemical characteristics of cellulosic biomass. *Biores. Technol.* **130**, 372-381.

Lamari, F. N., Kuh, R., Karamanos, N. K. (2003) Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *J. Chromatogr. B.* **793**, 15-36.

Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresour. Technol.* **87**, 167-198.

Lavarack, B.P., Griffin, G.J., Rodman, D. (2002) The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass Bioenerg.* **23**, 367-380

Li, X., Shi, X., Wang, M., Du, Y. (2011) Xylan chitosan conjugate - A potential food preservative. *Food Chem.* **126**, 520-525.

Lin, Y. S., Tseng, M. J., Lee, W. C. (2011) Production of xylooligosaccharides using immobilized endo-xylanase of *Bacillus halodurans*. *Process Biochem.* **46**, 2117-2121.

Liu, Z., Wang, L., Zhang, Y., Li, Y., Li, Z., Cai, H. (2017) Cellulose-lignin and xylan-lignin interactions on the formation of lignin-derived phenols in pyrolysis oil. *Bioresources* **12**, 4958-4971.

Ma, X., Zheng, X., Yang, H., Wu, H., Cao, S., Chen, L., Huang, L. (2016) A perspective on lignin effects on hemicelluloses dissolution for bamboo pretreatment. *Ind. Crop. Prod.* **94**, 117-121.

Mäkeläinen, H., Forssten, S., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., Ouwehand, A. C. (2010) Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. *Benef. Microbes.* **1**, 81-91.

Maneerat, W., Prasanpanich, S., Tumwasorn, S., Laudadio, V., Tufarelli, V. (2015) Evaluating agro-industrial by-products as dietary roughage source on growth performance of fattening steers. *Saudi J. Biol. Sci.* **22**, 580-584.

Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suarez, M.J., Zapata-Revilla, M.-A., TenorioSanz, M. D. (2010) Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT-Food Sci. Technol.* **43**, 1467-1470.

Meyer, A. S., Pinelo, M., Jonsson, G. (2009) Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. *Separ. Purif. Technol.* **70**, 1.

Misi, S.N., Forster, C.F. (2002) Semi-continuous anaerobic co-digestion of agrowastes. *Environ. Tech.* **23**, 45-451.

Mokhothu, T., John, M. J. (2015) Review on hygroscopic aging of cellulose fibres and their biocomposites. *Carbohydr. Polym.* **131**, 337-354.

Montgomery, R. (2004) Development of biobased products. *Bioresource Technol.* **91**, 1-29.

Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2006) Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem.* **41**, 1913–1923.

Mussatto, S. I., Mancilha, I. M. (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* **68**, 587–597.

Nabarlatz, D., Ebringerová, A., Montané, D. (2007) Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* **69**, 20–28.

Nabarlatz, D., Torras, C., Valls, R. G., Montane, D. (2007) Purification of xylooligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. *Separ. Purif. Technol.* **53**, 235.

Nobre, C., Cerqueira, M.A., Rodrigues, L.R, Vincente, A.A.,Teixeira, J.A. (2015) Production and extraction of polysaccharides and oligosaccharides and their use as new food aditives. U: Industrial biorefineries and white biotechnology (Pandey, A., Hofer, R., Taherzadeh, M., Madhavan Nampoothiri, K., Larroche, C., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 653-679.

Olano-Martin, E., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2002) Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J. App. Microbiol.* **93**, 505–511.

Otieno, D. O., Ahring, B. K. (2012) A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. *Bioresource Technol.* **112**, 285–292.

Otles, S., Despoudi, S., Bucatariu, C., Kartal, C. (2015) Food waste menagement, valorization, and sustainability in the food industry. U: Food Waste Recovery- Processing Technologies and Industrial Techniques [online] (Galanakis, C. M., ured.), Elsevier Inc. London Wall, UK, str. 15,

[https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=knHMBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Food+Waste+Recovery:+Processing+Technologies+%26+Techniques&ots=H\\_vHVkpInX&sig](https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=knHMBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Food+Waste+Recovery:+Processing+Technologies+%26+Techniques&ots=H_vHVkpInX&sig)



[=Q43\\_1gToSPx-GI633b\\_ftqDrVC0&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false>](#). Pristupljeno 5. srpnja 2017.

Palamae, S., Palachum, W., Christi, Y., Choorit, W. (2014) Retention of hemicellulose during delignification of oil palm empty fruit bunch (EFB) fiber with peracetic acid and alkaline peroxide. *Biomass Bioenerg.* **66**, 240-248.

Percival Zhang, Y. H. (2008) Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **35**, 367-375.

Phitsuwan, P., Sakka, K., Ratanakhanokchai, K. (2013) Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass Bioenerg.* **58**, 390-405.

Qing, Q., Li, H., Kumar, R., Wyman, C. E. (2013) Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment. u: *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*, (Wyman, C. E. , ured.), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, str. 391.

Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., Oktavianawati, I., Santoso, A. B., Puspaningsih, N. N. T. (2016) Isolation and hydrolysis xylan from soybean waste with endo- $\beta$ -1,4-D-xylanase of *Bacillus* sp. from soil termite abdomen. *Agric. Agric. Sci. Proc.* **9**, 371-377.

Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Heredia, A. (2006) Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 3-15.

Rodrigues, R. C. L. B., Rocha, G. J. M., Rodrigues, D., Izário Filho, H. J., Felipe, M. G. A., Pessoa, A. (2010) Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). *Bioresource Technol.* **101**, 1247–1253.

Samanta, A. K., Senani, S., Kolte, A. P., Sridhar, M., Sampath, K. T., Jayapal, N., Devi, A. (2012) Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corncobs. *Food Bioprod. Process.* **90**, 466–474.

Savage, G. P. (2001) Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand. *Plant Foods Hum. Nutr.* **56**, 75-82.

Shen, X., Perreault, H. (1998) Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr. A* **811**, 47-59.

Singh, R. D., Banerjee, J., Arora, A. (2015) Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* **5**, 19-30.

Sjöström, E. (1981) Wood polysaccharides. U: *Wood chemistry, fundamentals and applications*. (Sjöström, E., ured.) Academic Press, New York, str. 61-67.

- Stepan, H., Staudacher, E. (2011) Optimization of monosaccharide determination using anthranilic acid and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone for gastropod analysis. *Anal Biochem.* **418**, 24-29.
- Song, J. M., Wei, D. Z. (2010) Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomass Bioenerg.* **34**, 1930–1934.
- Sun, R., Hughes, S. (1998) Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp. *Carbohydr. Polym.* **36**, 293-299.
- Sun, J. X., Sun, X. F., Sun, R. C., Su, Y. Q. (2004) Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* **56**, 195–204.
- Sun, X., Wang, H., Han, X., Chen, S., Zhu, S. Dai, J. (2014) Fingerprint analysis of polysaccharides from different *Ganoderma* by HPLC combined with chemometrics methods. *Carbohydr. Polym.* **114**, 432-439.
- Sun, H. J., Yoshida, S., Park, N. H., Kusakabe, I. (2002) Preparation of (1-4)- $\beta$ -D-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: solubility of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1-4)- $\beta$ -D-xylooligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **337**, 657.
- Swaroop Dalli, S., Patel, M., Rakshit, S. K. (2017) Development and evaluation of poplar hemicellulose prehydrolysate upstream processes for the enhanced fermentative production of xylitol. *Biomass. Bioenerg.* **105**, 402-410.
- Swennen, K., Courtin, C. M., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Delcour, J. A. (2005) Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxxylooligosaccharides with different structures. *Carbohydr. Polym.* **62**, 283.
- Tan, S. S., Li, D. Y., Jiang, Z. Q., Zhu, Y. P., Shi, B., Li, L. T. (2008) Production of xylobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using *Thermotoga maritima* xylanase B (XynB) immobilized on nickel-chelated Eupergit C. *Bioresource Technol.* **99**, 200–204.
- Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M., Gibson, G. R. (2005) Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-Assessment of efficacy. *Curr. Pharm.Design* **11**, 75–90
- Vegas, R., Alonso, J. L., Dominguez, H., Parajo, J. C. (2005) Manufacture and refining of oligosaccharides from industrial solid waste. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**, 614.
- Vojvodic, A., Komes, D., Belscak-Cvitanovic, A., Busic, A. (2016) Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food Res. Int.* **89**, 565-573.
- Vojvodic, A., Komes, D., Belscak-Cvitanovic, A., Busic, A., Vovk, I., Sante, B. (2016) Carbohydrate monomer profiling of waste plant biomass using HPTLC and HPLC-PDA. *New Biotechnol.* **33**, 88.

- Wang, J., Yuan, X., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Wang, C. (2009) On-line separation and structural characterization of feruloylated oligosaccharide from wheat bran using HPLC–ESI-MS<sup>n</sup>. *Food Chem.* **115**, 1529–1541.
- Westerman, P. W., Bicudo, J. R. (2005) Management considerations for organic waste use in agriculture. *Bioresource Technol.* **96**, 215–221.
- Yang, R., Xu, S., Wang, Z., Yang, W. (2005) Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylo-oligosaccharides. *Food Sci. Tech.* **38**, 677–682.
- Yáñez, R., Alonso, J. L., Parajó, J. C. (2006) Enzymatic saccharification of hydrogen peroxide-treated solids from hydrothermal processing of rice husks. *Process Biochem.* **41**, 1244–1252.
- Yuan, Q. P., Zhang, Z. M., Yang, X. J. (2004) Pilot-plant production of xylooligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1073.
- Zhu, S., Wu, Y., Zhang, X., Li, H., Gao, M. (2006) The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technol.* **97**, 1964–1968.